

Vol XVII, No. 1

January, 1933

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

QP
501
J67

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

TOKYO

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY,

11 Itchome Kagacho, Ushigome.

Price: \$ 5.50 per volume.

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

WITH THE COOPERATION OF

SHIGERU AKAMATSU, Chiba; TORASABURO ARAKI, Kyoto; NOBORU ARIYAMA, Niigata; KIKO GOTO, Kyoto; KIKUNAE IKEDA, Tokyo; KATSUJI INOUE, Sendai; SHIGERU TODA, Hoten; SHICHIZO KATO, Kumamoto; MITSUGI KIKUCHI, Tokyo; KEIZO KODAMA, Fukuoka; CHIKAHIKO KOIZUMI, Tokyo; SHIGERU KOMATSU, Kyoto; YASHIRO KOTAKE, Osaka; KANAYE MAYEDA, Kyoto; KOJI MIYAKE, Sapporo; TAKEYOSHI NAGAYAMA, Tokyo; KAORU OGURO, Sapporo; YUZURU OKUDA, Fukuoka; TETSUTARO TADOKORO, Sapporo; TAKAOKI SASAKI, Tokyo; GOZO SATO, Keijo; TORAI SHIMAMURA, Tokyo; TAYEI SHIMIDZU, Okayama; KENZO SUTO, Kanazawa; UMETARO SUZUKI, Tokyo; YUTAKA TERUUCHI, Tokyo; MASAJI TOMITA, Nagasaki; MAKOTO YAMAKAWA, Tokyo; KIYOHISA YOSHIMURA, Kagoshima.

EDITED BY

SAMURO KAKIUCHI

Professor in the Tokyo Imperial University

VOLUME XVII

TOKYO

1933

COPYRIGHT 1933

BY

THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

PUBLISHED BY THE JOURNAL OF BIOCHEMISTRY

CONTENTS TO VOLUME XVII.

No. 1, January, 1933.

	Page
KURAMOTO, Tsuneo u. YUUKI, Hideo. Einfluss der Gallensäure auf den Phosphorstoffwechsel (III). Blutphosphat bei Zufuhr von Cholsäure mit Adrenalin und vegetatives Nervensystem	1
YOSHIO, Keizo. Über den Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des Adrenalins	11
HOSIZIMA, Tadao. Einfluss der Gallensäure auf den Calciumstoffwechsel IV. Veränderungen im Kalkzustand durch Zufuhr von Gallensäure bei normaler sowie thyreoparathyreopraver Hündin	29
TAKEUCHI, Tadashi. Über den Einfluss verschiedener organischer Verbindungen auf die Urease	47
YAMADA, Susumu. On the effect of insulin, epinephrine and phlorhizin on the lactic acid content and the distribution of phosphates in the blood of rabbits	61
SAWADA, Masao. Über die Beziehungen der alimentären Hypoglykämie, sowie des „Staub“-Effectes zu verschiedenen Zuckerarten	91
TANAKA, Keizo. Keimdrüsenautolyse unter dem Einfluss der Gallensäure	111
KASHIWAMURA, Osamu. Untersuchungen über die Blutgerinnung. I. Mitteilung. Über die aus der Niere erhaltene blutgerinnungshemmende Substanz	117
TOYAMA, Jun-ichi. A simple method for the isolation of xanthine oxidase from milk	131
KAGIYAMA, Sakae. Über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und Reduktionsvermögens in den Geweben. (Vierte Mitteilung) Über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und Reduktionsvermögens in den Geweben des Hühnerembryos	135
WATANABE, Jūkichi. The action of sugar on amino acid. II. The reaction in the presence of oxidizing agents	147
SHIBUYA, Shigetoshi. Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im Hundeorganismus	159

No. 2, March 1933.

MATSUI, Jujiro. Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente	163
CHIWAKI, Jinji. Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen diät. II. Mitteilung. Die Verhältnisse zwischen der Abschwächung der	

Glykolyse und der Verteilung des freien und gebundenen Cholesterins im Kaninchenblute bei der Fütterung mit Cholesterin	171
CHIWAKI, Jinji. Über die Beeinflussung der Hämoglykolyse durch die Nahrung, mit besonderer Berücksichtigung der avitaminotischen diät. III. Mitteilung. Die Hämoglykolyse der mit poliertem Reis gefütterten Kaninchen	215
MATSUI, Jujiro. Konstitution der Polypeptide und proteolytische Fermente	253
TSUDJI, M. Vorbemerkung zu Durchblutungsversuchen des Magens	259
YOSHIDA, Y. Durchblutungsversuche des Magens. (Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji) I. Mitteilung. Durchblutung des Magens mit Histamin	261
MATSUOKA, Y. Durchblutungsversuche des Magens. (Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji) II. Mitteilung. Durchblutung des Magens mit dl-Alanin und d-Alanin	267
IKEBE, K. Durchblutungsversuche des Magens. (Ausgeführt unter der Leitung von Prof. Dr. M. Tsudji) III. Mitteilung. Über den Acetonkörper im Magensaft, zugleich über das Schicksal des l-Leucins in der Magenwand	275
ISHIYAMA, Takashi. Über fermentative Aufschliessung des Diketo-piperazinrings	285
TAKAHASHI, Takehiko. A note on measuring methods of methylglyoxal	299
WATANABE, Jukichi. On muscle glyoxalase	307

No. 3, May, 1933.

NAKASHIMA, Minoru et HAYASHI, Katsuzô. Sur le potentiel d'oxydro-réduction de la rétine	315
MUNEMURA, Sanmatsu. Über den Einfluss der Electrolyten auf die Phosphomonoesterase und Pyrophosphatase	343
HORI, Migiwa. On the accuracy of some clinical methods of estimating the protein present in the urine	367
S. KOZAWA, R. IWATSURU und T. ADACHI. Beiträge zur Rivalta'schen Reaktion	375
SHIBUYA, Shigetoshi. Über das Schicksal der Dehydrocholsäure im Krötenorganismus	385
SHIBUYA, Shigetoshi u. TANAKA, Toshiyuki. Beiträge zur Kenntnis der Gallensäure aus der Fistelgalle des Kaninchens	391
SHIMADA, Jithuichi. Studies in experimental scurvy. XVI. The effect of irradiated narcotin on experimental scurvy	395
TOMITA, Masaji u. FUJIWARA, Hidekatsu. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien	401
FUJIWARA, Hidekatsu u. TSUNOO, Shigeru. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. II. Physikalische Eigenschaften der Perivitellin-flüssigkeit des Riesensalamandereies	407
ISEKI, Toshinori und KUMON, Teki. Beiträge zur Embryochemie der	

Contents

v

Amphibien. III. Über das Verhalten der anorganischen Bestandteile bei der Bebrütung des Riesensalamandereies	409
ISEKI, Toshinori, KUMON, Teki, TAKAHASHI, Ichimatsu und YAMASAKI, Fujito. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. IV. Über das Verhalten der N-haltigen Verbindungen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies	413
KATAOKA, Eisei u. TSUNOO, Shigeru. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. V. Über den Kohlenhydratstoffwechsel bei der Bebrütung des Riesensalamandereies	417
KATAOKA, Eisei u. TAKAHASHI, Ichimatsu. Beiträge zur Embryochemie der Amphibien. VI. Über das Verhalten der Fettsubstanzen bei der Bebrütung des Riesensalamandereies	419
KUMAMI, Shiro. Über den Schwefelgehalt des arteriellen bzw. venösen Blutes des Pankreas	423
TOYAMA, Jun-ichi. The potentiometric study on the Schardinger reaction	433
MATSUURA, Katsumichi. Experimentelle Untersuchungen über die Verteilung der Kohlehydrate in den Organen und Geweben bei der Insulin- und Synthalin-hypoglykämie, beim Hunger sowie bei Funktionsstörungen der Leber	441
MATSUZAKI, Haruo. Vergleichende Untersuchungen über die verschiedenen glykolytischen Kofermente	457
TANAKA, Keizo. Über die Sterine des Reisembryos. (I)	483

EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DEN PHOSPHORSTOFFWECHSEL (III).

Blutphosphat bei Zufuhr von Cholsäure mit Adrenalin und vegetatives Nervensystem.

VON

TSUNEW O KURAMOTO u. HIDEO YUUKI.

(Aus der Gynäkologischen Klinik und dem physiologisch-chemischen Institut
zu Okayama. Vorstand: Prof. Dr. K. Ando und Prof. Dr. Shimizu.)

(Eingegangen am 9. September 1932)

Der Einfluss der Gallensäure auf den Phosphorstoffwechsel wurde bereits von Kimura (1931), Sekitoo (1930), Fuziwara (1931), Hatakeyama (1927) und Kawada (1931) untersucht, und es wurde gefunden, dass infolge der Steigerung des Nucleinstoffwechsels durch die Gallensäure der Phosphorsäuregehalt des Blutes sowie die Phosphorsäureausscheidung in Harn und Galle deutlich vermehrt werden. Nach Itoo (1930) sollen der P_H der Lebergalle und die Alkalireserve des Blutes des Hundes durch Zufuhr von Cholsäure gesteigert werden, wodurch die Alkalosis im Organismus bedingt wird. Aus den oben erwähnten Ergebnissen scheint sich mir zu ergeben, dass der Phosphatpuffer im Blut dadurch vermehrt wird. Dieses vermehrte Blutphosphat muss sich also unter Bildung von organischen Phosphorsäureverbindungen am intermediären Kohlenhydratstoffwechsel beteiligen, indem z. B. aus Hexosephosphorsäure Glykogen synthetisiert wird.

In der Tat haben Sokhey (1924), Allan (1924), Engelhardt u. Parschin (1929), Blatherwick, Bell u. Hill (1924), Matsuoka (1928) und Nakamura (1929) durch Zufuhr von Insulin ohne oder mit Glukose einen bedeutenden Abfall des Blutphosphates mit gleichzeitigem Ansteigen des organischen Phosphates, d. h. der Hexosephosphorsäure, im Muskel beobachtet.

Nach dem Glykolyseversuch von Bierry u. Moquet (1925) verschwindet der Blutzucker unter Abnahme der Phosphorsäure. Wenn der Zucker erschöpft ist, so vermehrt sich die Phosphorsäure

wieder.

Es ist allgemein bekannt, dass das Adrenalin die Glykogenolyse der Leber und des Muskels fördert, dass dagegen eine kleine Menge desselben die Glykogenie fördert, wie Miki (1932) u. Chikamori (1932) bewiesen haben. Wenn die Phosphorsäure im Blut sich an der Glykogenie beteiligt, so muss sie durch Zufuhr von Adrenalin oder Gallensäure beeinflusst werden. So haben Matsuoka (1928) und Allan, Dickson u. Markowitz (1924) die Vermehrung der Blutphosphorsäure durch Zufuhr von Adrenalin (0.5–1,3 mg pro Kilo) beobachtet.

Nach Bollinger u. Hartman (1925), Kurokawa (1924/25), Masamune u. Ueda (1929) und Nakamura (1929) soll das anorganische Phosphat im Blut sowie seine Ausscheidung im Harne durch Zufuhr von Adrenalin sich vermindern.

Was den Einfluss des vegetativen Nervensystems und der Hormone, z. B. des Adrenalins, auf den Nucleinstoffwechsel betrifft, so soll nach Dresel u. Ullmann (1921), Harpuder (1924), Fleischmann u. Salecker (1914) und Pohl (1917) durch seine Sympathicusreizung das Adrenalin den Blutphosphatgehalt und die Phosphatausfuhr im Harne steigern, weil sie dabei Harnsäure- und Allantoinausscheidung im Harn vermehrt gefunden haben.

Über den Einfluss des Adrenalins auf den Phosphatstand im Blut wird also noch gestritten.

Nach Tsuji (1930) wirkt die Gallensäure auf den Sympathicus lähmend und den Parasympathicus reizend. Aber konnten das Blutphosphat und die Phosphatausscheidung im Harne vermehrt werden.

Nun reguliert die Gallensäure mit der Funktion des vegetativen Nervensystems den Kohlenhydratstoffwechsel und sie fördert die Glykogenie in der Leber und im Muskel, indem die Synthese der Hexosephosphorsäure durch Gallensäure gefördert wird, wie Uraki (1931) beobachtet hat.

Im oben erwähnten Sinne haben wir bei normalen, splanchnikotomierten und vagotomierten Kaninchen den Einfluss von Gallensäure und Adrenalin auf den Phosphatstand im Blut untersucht, einerseits um damit den Zusammenhang zwischen der vege-

tativen Nervenfunktion und dem Phosphatstoffwechsel klarzustellen, andererseits in der Hoffnung, die Bedeutung der Gallensäure und des Adrenalins im Nuclein- und Kohlenhydratstoffwechsel weiter zu kennen.

Experimenteller Teil.

Zum Versuch wurden gut ausgewachsene, mittelgrosse, männliche Kaninchen verwendet, die unter möglichst gleichen Bedingungen gezüchtet worden waren.

Die Versuche wurden an den Kaninchen stets ausgeführt, nachdem sie 24 Stunden in nüchternem Zustand gewesen waren. Zur Bestimmung des nüchternen Blutphosphates wurden dem ausgewachsenen, gut ernährten Kaninchen in der natürlichen Haltung ca. 10 ccm Blut aus den Ohrvenen unter Durchschneidung der Ohrvenen mit Injektionsnadeln entzogen, die mit je 3 Tropfen einer konzentrierten Na-citratlösung gefüllt worden waren. Die 10 ccm Blut wurden in einen mit 10 ccm Wasser gefüllten Kolben genau abpipettiert, und unter Enteiweissung nach Schenck wurde mittelst der Methode von Embden (1921) die Phosphorsäure gravimetrisch bestimmt.

In der Folge wurde nach je einer Woche Pause denselben Kaninchen das Blut entnommen, nachdem vorher den normalen Kaninchen 1 ccm einer 1%igen Na-cholatlösung resp. 0,2 ccm einer 0,1%igen Adrenalinchloridlösung subcutan verabreicht worden war, und nach 2 Stunden das Blutphosphat bestimmt.

Die Splanchnikotomie der Kaninchen wurde nach Schulze (1900) und die Vagotomie nach Freund (1913) ausgeführt. 2 Wochen nach der Operation wurde der Einfluss der Cholsäure und des Adrenalins auf das nüchterne Blutphosphat in gleicher Weise wie oben beobachtet.

Die Resultate sind in den folgenden Tabellen I–III zusammengestellt.

ERGEBNISSE.

Aus den Tabellen I, II u. III lässt sich ersehen, dass der nüchterne Phosphatwert des normalen Kaninchenblutes nicht nur

TABELLE I.
(Kontrolle und nach Splanchnikotomie 13. Sept.)

Nr. u. Körper- gewicht(g)	Datum	24/VII (28/IX)	31/VII (6/X)	10/VIII (13/X)
		Nüchtern (mg %)	1 cem 1% Cholatlös. pro Kilo (mg %)	0,2 cem 0,1% Adrenalinlös. pro Kilo (mg %)
1	{ 2050 (—)	25,51 (—)	26,13 (—)	26,78 (—)
2	{ 2100 (2250)	21,35 (19,76)	21,99 (21,35)	24,01 (16,14)
3	{ 1850 (1950)	23,16 (19,65)	24,01 (22,85)	26,24 (—)
4	{ 2100 (2250)	22,73 (19,76)	24,33 (22,52)	25,28 (19,56)
5	{ 2100 (2200)	21,67 (18,06)	23,05 (21,92)	24,22 (17,32)
6	{ 1750 (1850)	22,73 (19,44)	23,27 (22,84)	24,54 (17,78)
7	{ 1950 (2000)	21,03 (18,28)	22,52 (20,27)	26,78 (15,24)
8	{ 2000 (2100)	21,57 (18,85)	22,63 (19,12)	25,60 (14,82)
9	{ 2200 (2250)	22,10 (18,17)	22,63 (20,62)	25,28 (—)
10	{ 1950 (—)	20,72 (—)	22,10 (—)	23,48 (—)

() zeigt den Wert beim Versuch nach Splanchnikotomie.

individuell, sondern auch je nach der Jahreszeit eine Schwankung aufweist.

Nach der Splanchnikotomie vermindert sich das Blutphosphat, während es nach der Vagotomie sich vermehrt, wie aus den Tabellen I, II u. III ersichtlich ist. Das vegetative Nervensystem reguliert bekanntlich das Säure-Basengleichgewicht im Tierkörper, und die Phosphorsäure spielt als eine Puffersubstanz des Blutes eine Rolle.

Die Veränderung des Blutphosphates bei vegetativer Neurotomie beeinflusst also wenigstens die Alkalireserve des Blutes, wie

TABELLE II.
(Kontrolle und nach Splanchnikotomie 27. Dec.)

Nr. u. Körper- gewicht(g)	Datum	7/XII (8/I)	(15/I)	14/XII (22/I)
		Nüchtern (mg %)	0,2 cem 0,1% Adrenalinlös. pro Kilo (mg %)	0,2 cem 0,01% Adrenalinlös. pro Kilo (mg %)
1 {	1950 (—)	17,52 (—)	(—)	14,04 (—)
2 {	2200 (2050)	19,33 (17,75)	(14,44)	14,04 (18,08)
3 {	2250 (—)	19,65 (—)	(—)	14,98 (—)
4 {	2450 (2350)	18,15 (15,70)	(12,73)	13,38 (17,06)
5 {	1800 (1680)	17,94 (16,11)	(15,60)	14,87 (17,48)
6 {	2400 (2200)	17,31 (16,21)	(14,65)	14,14 (16,26)
7 {	2850 (2500)	17,83 (15,81)	(14,34)	15,40 (16,05)
8 {	3100 (2900)	17,31 (15,29)	(13,05)	14,44 (15,94)

() zeigt den Wert beim Versuch nach Splanchnikotomie.

Ito (1930) in seinem Versuch beobachtet hat.

Die Phosphorsäure im Blut wird durch Zufuhr von Cholsäure gesteigert. Der Phosphatgehalt des Blutes von splanchnikotomierten Kaninchen wird durch Zufuhr von Cholsäure viel stärker gesteigert als der von normalen Tieren, während er nach der Vagotomie gerade umgekehrt, verglichen mit dem bei normalen Kaninchen, sich vermindert, wie aus den Tabellen I u. III ersichtlich ist.

Aus den Befunden scheint uns hervorzugehen, dass das sympathische Nervensystem in der Leber durch die Splanchnikotomie in Erregung versetzt wird, und dass der Vagus durch die Gegenregulation der beiden vegetativen Nervenfunktionen durch die

TABELLE III.
(Kontrolle und nach Vagotomie 8. Nov.)

Nr. u. Körper- gewicht(g)	Datum	20/X	26/X	2/XI	
		(20/XI)	(27/XI)	(3/XII)	(10/XII)
		Nüchtern (mg %)	1 cem 1% Cholatlös. pro Kilo (mg %)	0,2 cem 0,1% Adrenalinlös. pro Kilo (mg %)	0,2 cem 0,01% Adrenalinlös. pro Kilo (mg %)
1	{ 1950 (—)	20,72 (—)	20,73 (—)	23,69 (—)	(—)
2	{ 2100 (2080)	21,24 (22,10)	22,31 (16,46)	23,90 (13,10)	(20,40)
3	{ 2250 (2280)	19,12 (21,03)	21,03 (17,54)	22,31 (14,33)	(19,65)
4	{ 2150 (—)	20,06 (—)	22,63 (—)	23,38 (—)	(—)
5	{ 2300 (2100)	21,57 (23,05)	23,05 (17,15)	25,18 (13,75)	(—)
6	{ 2000 (2000)	18,60 (21,67)	20,06 (15,50)	21,99 (13,10)	(18,59)
7	{ 1950 (2000)	18,92 (20,37)	20,37 (15,95)	23,05 (12,20)	(18,37)
8	{ 2200 (2000)	16,14 (18,28)	17,33 (—)	22,52 (—)	(—)
9	{ 2000 (1950)	17,85 (19,44)	20,11 (16,29)	23,05 (12,43)	(18,26)
10	{ 2250 (2000)	19,55 (21,57)	22,31 (17,75)	23,59 (15,42)	(21,25)

zeigt den Wert beim Versuch nach Vagotomie.

Cholsäure immer mehr gereizt wird.

Es ist bekannt, dass die Glykogenbildung der Leber durch Zufuhr von Cholsäure gefördert wird. Die Verminderung des Blutphosphates von vagotomierten Kaninchen bei Zufuhr von Cholsäure ist also auf die den sympathischen Nerv lähmende Wirkung der Cholsäure zurückzuführen.

Die Zufuhr einer grösseren Menge von Adrenalin (2 mg pro Kilo) vermehrt das Blutphosphat des normalen Kaninchens wie aus

den Tabellen I, II u. III ersichtlich ist, während sie dagegen das des splanchnikotomierten Tieres herabsetzt. Beim vagotomierten Kaninchen wird das Blutphosphat durch Zufuhr derselben Menge von Adrenalin beträchtlich herabgesetzt.

Das beruht höchstwahrscheinlich darauf, dass das Adrenalin beim normalen Kaninchen unter Reizung des sympathischen Nerven auf das Leber- und Muskelglykogen mobilisierend, auf den Nucleinstoffwechsel fördernd einwirkt, dass aber der Vagus bei Splanchnicusdurchschneidung durch die Gegenregulation der beiden Nerven in Übererregung versetzt wird, wodurch die Wirkung des Adrenalins eine Abschwächung erfährt. Das Adrenalin wirkt hierbei wie ein Aufbauhormon auf das Leberglykogen, wie es bei der Zufuhr einer kleineren Menge von Adrenalin der Fall war. Dadurch wird das Blutphosphat für die Glykogenbildung in der Leber gut verwertet, wodurch sein Gehalt im Blut herabgesetzt wird.

Beim vagotomierten Kaninchen dürfte wohl die Insulinsekretion aus der Pankreas herabgesetzt werden, indem der sympathische Nerv durch die Gegenregulation der beiden Nerven in Übererregung versetzt wird.

In diesem Fall dürfte wohl die Zufuhr des Adrenalins unter Gegenregulation der beiden Nerven die Glykogenbildung der Leber zur Folge haben, wie Miki (1932) in seinem Versuch beobachtet hat, indem die Verwertung des Blutphosphates in der Leber gesteigert wird.

Kawashima und Iwanaga (1930) haben bereits gefunden, dass durch Vagotomie die Zuckerausscheidungsschwelle bei Zufuhr des Adrenalins herabgesetzt wird. Beim vagotomierten Kaninchen wird also das Blutphosphat durch Zufuhr von Adrenalin herabgesetzt.

Bei Zufuhr von kleineren Menge von Adrenalin (0,2 mg pro Kilo) vermindert sich das Blutphosphat des normalen Kaninchens. Hierbei dürfte wohl das Adrenalin als ein Aufbauhormon des Leberglykogens wirken, indem das Blutphosphat für die Glykogenbildung gut verwertet wird. Diese Tatsache wurde schon von Pollak (1909), Siegel (1929) und Cori u. Cori (1927) bewiesen.

Durch Vagotomie wird diese Wirkung des Adrenalins abgeschwächt, was höchstwahrscheinlich darauf beruht, dass die Menge des zugeführten Adrenalins nicht ausreichend gewesen ist, um den übererregten Nerv zu beeinflussen.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Das „nüchterne“ Blutphosphat des Kaninchens beträgt im Sommer mehr als im Winter.

2. Das „nüchterne“ Blutphosphat des Kaninchens wird durch Splanchnikotomie vermindert, dagegen durch Vagotomie vermehrt.

3. Die Zufuhr von Cholsäure steigert den Blutphosphatgehalt von normalen Kaninchen, und diese steigernde Wirkung der Cholsäure wird durch Splanchnikotomie verstärkt, dagegen durch Vagotomie herabgesetzt.

4. Die Zufuhr einer grösseren Menge von Adrenalin veranlasst eine merkliche Vermehrung des Blutphosphates von normalen Kaninchen, und diese vermehrende Wirkung des Adrenalins wird durch Splanchnikotomie sowie Vagotomie herabgesetzt.

5. Die Zufuhr einer kleineren Menge von Adrenalin vermindert das Blutphosphat, und diese vermindernde Wirkung des Adrenalins wird durch Splanchnikotomie sowie Vagotomie erheblich abgeschwächt.

Zum Schlusse ist es uns eine angenehme Pflicht, den Herren Professoren Dr. T. Shimizu und Dr. K. Ando unseren herzlichsten Dank für ihre überaus freundliche Anleitung sowie ihre nützlichen Anregungen bei Ausführung unserer Arbeit auszusprechen. Auch möchten wir Herrn M. Teraoka am Physiologisch-chemischen Institut für seine Unterstützung bei unseren Versuchen bestens danken.

LITERATUR.

- Allan, F. N., Dickson, B. R. u. Markowitz, J. (1924): *Americ. Jl. Physiol.*, **70**, 333.
Bierry, H. u. Moquet, L. (1925): *Rona's Berichte*, **31**, 587.
Blatherwick, N. R., Bell, M. u. Hill, E. (1924): *Jl. Biol. Chem.*, **61**, 241.
Bolliger, A. u. Hartman, F. W. (1925): *Jl. Biol. chem.*, **64**, 91.

- Chikamori, S. (1932): Okayama Igakkai Zasshi, **44** Jg. 1567.
 Cori, C. F. u. Cori, G. T. (1927): Bioch. Z., **206**, 39.
 Dresel, K. u. Ullmann, H. (1921): Zs. f. gesamt. exp. Med., **24**, 214.
 Embden, G. (1921): Zs. Physiol. Chem., **113**, 138.
 Engelhardt, W. A. u. Parschin, A. N. (1929): Bioch. Zs., **208**, 221.
 Fleischmann u. Salecker (1914): Zs. Klin. Med., **80**, 456.
 Freund, H. (1913): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **72**, 295.
 Fuziwara, K. (1931): Jl. of Bioch., **13**, 43.
 Harpuder, K. (1924): Zs. exp. Med., **42**, 1.
 Hatakeyama, T. (1927): Jl. of Biochem., **8**, 248.
 Itoo, T. (1930): Arb. med. Univ. Okayama, **2**, 103.
 Kawada, Y. (1931): Jl. of Bioch., **13**, 133.
 Kawashima, S. u. Iwanaga, (1930): Jl. of Bioch., **11**, 293.
 Kimura, T. (1931): Jl. of Bioch. **14**, 51.
 Kurokawa, T. (1924/25): Tohoku Jl. exp. Med., **5**, 438.
 Masamune, H. u. Ueda, A. (1929): Fukuoka Ikadaigaku Zasshi, **22**, 918.
 Matsuoka, B. (1928): Nisshinigaku, **17**, 720.
 Miki, T. (1932): Bioch. Zs., **247**, 445.
 Nakamura, H. (1929): Kioto Ikadaigaku Zasshi, **3**, Abt. B. 217.
 Pohl, J. (1917): Bioch. Zs., **78**, 200.
 Pollak, L. (1909): Arch. f. exp. Path. u. Pharm., **61**, 149.
 Schulze, O. (1900): „ **43**, 204.
 Sekitoo, T. (1930): Jl. of Bioch., **11**, 251.
 Siegel, R. (1929): Klin. Wschr., 1069.
 Sokhey, S. S. u. Allen F. N. (1924): Bioch. Jl., **18**, 1170.
 Tsuji, K. (1930): Jl. of Bioch., **12**, 139.
 Uraki, J. (1931): „ **14**, 128.

ÜBER DEN EINFLUSS DER ERNÄHRUNG AUF DIE WIRKUNG DES ADRENALINS.*

VON

KEIZO YOSHIO.

(Aus der med. Universitätsklinik von Prof. Dr. N. Kageura,
Nagasaki, Japan.)

(Eingegangen am 15. September 1932)

Der Einfluss der Ernährung auf die Wirkung einer Substanz, die einem Organismus zugeführt wird, ist schon vielfach studiert worden, jedoch noch nicht in allen Richtungen vollständig geklärt. Auch über das Adrenalin sind in diesem Zusammenhang die bisherigen Angaben ziemlich zahlreich. Der Zucker, der nach Adrenalininjektion im Blut bzw. im Harn auftritt, stammt zweifellos zum Teil aus dem Leberglykogen, dessen Menge nach der Adrenalinzufuhr in der Regel deutlich abnimmt. (Doyon u. Kareff, 1904; Drummond u. Paton, 1904; Wolonik, 1905; Gatin-Gruzewska, 1906; Agadschanianz, 1907; Pollak, 1909; etc.) Blum (1902) hatte bei Hungerhunden ein Fehlen oder eine Verminderung der Adrenalinglykosurie beobachtet. Herter und Richards (1902) geben ebenfalls an, dass hungernde oder durch Phlorizin des Glykogens beraubte Hunde keine Glykosurie nach Adrenalinzufuhr zeigen; und Ritzmann (1909) fand, dass die bei intravenösem Einlauf sehr dünner Adrenalinlösungen auftretende Glykosurie mehr oder weniger in proportionalem Verhältnis zum Glykogenreichtum der Tiere stehe, was der Beobachtung Ikushimas (1929) entspricht. Auch wenn die Leber durch Unterbindung der Arteria hepatica glykogenfrei gemacht worden war, wirkt Adrenalin nicht mehr blutzuckervermehrend (Collens, Shelling und Byron, 1926). Biberfeld (1919) sah, dass Hunde bei Kohlenhydratnahrung unter Adrenalin stark glyko-

* Die vorliegende Mitteilung wurde zum Teil Ende Okt. 1931 in der med. Gesellschaft zu Nagasaki, zum Teil Anfang April d. J. in der Japan. Gesellschaft für innere Medizin in Tokyo öffentlich vorgetragen.

surisch waren, bei Fleischnahrung nicht. Nach Yoshida (1930) fällt die Adrenalinhyperglykämie bei der überwiegenden Mehrzahl der Kaninchen in hochgradigem Hungerzustande (9–20 Tage) deutlich geringer aus als bei Normaltieren.

Andererseits fand Bang (1913) aber, dass auch bei Hungerkaninchen, deren Glykogendepots eine deutliche Abnahme zeigen, noch Hyperglykämie nach Adrenalin in fast gleichem Masse ausgelöst werden kann, wie bei gefütterten, was auch Asakawa (1920), Oka (1922), Markowitz (1925), Ohara (1925), Kinoshita (1926), Susaki (1926) etc. bestätigen. Eine ungefähr gleich gedeutete Arbeit von Fuentes und seinen Mitarbeitern (1931), auf die ich noch zurückkommen werde, liegt auch vor.

Diese Abweichung der Versuchsergebnisse ist m. E. wesentlich auf die Verschiedenheit der Untersuchungsbedingungen zurückzuführen.

1922 fand Kageura, dass sowohl bei Hunden wie auch bei Menschen die Assimilationsfähigkeit für Kohlenhydrat bei Eiweiss-Fettdiät deutlich abnimmt. Auf Grund seiner Versuchsergebnisse mit überlebender Leber (1924) ist er der Meinung, dass dabei die Veränderung der Leberfunktion, vornehmlich die Herabsetzung der Fähigkeit zur Glykogenbildung, die durch die genannte Ernährungsweise hervorgerufen worden war, ein ätiologisches Moment darstellen müsse. Damals veröffentlichte auch Staub (1922), unabhängig von Kageura, eine ähnliche Arbeit. Nach Bang (an Kaninchen) und Ikeziri (1926) (an Hunden) ist die alimentäre Hyperglykämie nach Zuckerzufuhr bei Hungertieren bedeutend stärker als bei Normaltieren. Vor kurzem stellte Iwao (1931) fest, dass bei Hungerhunden, sowie bei solchen mit Eiweiss-Fettdiät, Salvarsanikterus in der Regel leichter und ausgesprochen hervorgerufen werden kann (als bei Normaltieren), und dass der Gehalt der Leber an Glykogen in diesen Ernährungszuständen mehr oder weniger beträchtlich abnimmt. Embden fand, dass die mit Zuckerlösung durchströmte Leber von Hunden, die vor der Tötung mehrere Tage gehungert hatten, der Glykogenie nicht mehr fähig ist. Auch nach Barrenscheen (1914) fiel in glykogenfreien Lebern von Hungertieren die Glykogenbildung

erheblich schwächer aus, als in glykogenhaltigen.

Aus diesen Tatsachen kann man wohl folgern, dass sowohl Hunger als auch einseitige Ernährungsweise durch Eiweiss-Fettdiät, die beide hinsichtlich Kohlenhydratkarenz sich ähnlich sind, etwa dieselben schädigenden Einflüsse auf die Funktion der Leber, insbesondere auf die Assimilationsfähigkeit für Kohlenhydrat, ausüben können. Bei solcher Sachlage scheint es nicht ohne Interesse, die Frage zu erledigen, wie die Adrenalinwirkung von der Ernährung abhängig ist. Freilich haben Abderhalden und Wertheimer (1924), die auf diesem Gebiete viel gearbeitet haben, bereits angegeben, dass bei mit Eiweiss-Fett ernährten Ratten die Wirkung des Adrenalins stärker ausfällt, wie bei mit gemischter Kost ernährten.

Die vorliegende Arbeit hat den Zweck, den Einfluss der Ernährung auf die hyperglykämisierende Wirkung des Adrenalins und die Beziehung zwischen dieser Wirkung und dem Glykogenbestand des Organismus eingehend zu studieren, und somit gleichzeitig zur Pathologie des Kohlenhydratstoffwechsels etwas bei zu tragen, indem einerseits die Hyperglykämie nach Adrenalinzufuhr und andererseits der Glykogenegehalt sowohl der Leber wie auch des Muskels bei verschiedenen Ernährungsweisen vergleichend untersucht wurden.

I. ÜBER BLUTZUCKER.

Neun gesunde, männliche und ausgewachsene Hunde von verschiedenen Rassen, die zuerst, wie bei uns üblich, mit kohlenhydratreicher gemischter Kost genährt worden waren, wurden nur mit magerem Rindfleisch gefüttert, bekamen dann bei Gleichhalten der Fleischration eine gewisse Menge Schweineschmalz dem Futter zugesetzt und wurden endlich wieder mit gemischter Kost genährt. Ausnahmsweise wurde bei 3 Tieren—Nr. 1, 4 und 5—eine Periode von reiner Fettkost eingeschaltet, aber bei zwei von diesen—Nr. 1 und 4—wurde die Periode von Eiweiss+Fett ausgeschaltet. Abgesehen von der Eiweiss+Fett-Periode, wo der Kaloriengehalt der Nahrung selbstverständlich vergrössert werden musste, wurde er meinen früheren Erfahrungen entsprechend so bestimmt, dass das

TABELLE

Nr. des Hundes ⑥	Körpergewicht (kg)	Datum	Nahrung	Dosis des Adrenalins 0.10-0.21 mg pro kg Körpergewicht
Nr. 1.	3.90	(1930) 23/V	gemischte Kost	0.75
	3.95	26/ „	23-25/V	0.75
	3.90	29/ „	26-28/ „	0.75
	3.85	3/VI	1-2/VI	0.75
	3.45	14/ „	3-13/ „	0.75
	3.70	19/ „	14-18/ „	0.75
	3.60	23/ „	19-22/ „	0.75
	3.80	26/ „	24-25/ „	0.75
	3.80	28/ „	26-27/ „	0.75
	3.90	30/ „	28-29/ „	0.75
	3.60	3/VII	30/VI-2/VII	0.75
			„ „	
Nr. 4.	4.85	5/VIII	gemischte Kost	1.00
	4.75	9/ „	5-8/VIII	1.00
	4.85	21/ „	9-20/ „	1.00
	5.00	26/ „	21-25/ „	1.00
	4.70	29/ „	27-28/ „	1.00
	4.75	31/ „	29-30/ „	1.00
	4.70	11/IX	31/VIII-10/IX	1.00
	4.55	20/ „	11-19/IX	1.00
Nr. 5.	6.60	6/X	gemischte Kost	1.30
	6.90	10/ „	6-9/X	1.40
	6.35	14/ „	10-13/ „	1.30
	6.85	20/ „	14-19/ „	1.40
	6.45	24/ „	20-23/ „	1.30
	6.55	27/ „	24-23/ „	1.30
	6.55	30/ „	28-29/ „	1.30
	6.65	4/XI	30/X-3/XI	1.35
	6.45	7/ „	4-6/ „	1.30
			„ „	
Nr. 8.	8.20	(1931) 27/I	gemischte Kost	1.65
	7.70	30/ „	27-29/I	1.55
	7.50	3/II	30/I-2/II	1.50
	7.35	9/ „	6-8/ „	1.50
	7.55	12/ „	9-11/ „	1.50
	8.15	17/ „	12-16/ „	1.60
	8.05	20/ „	17-19/ „	1.60
	8.50	24/ „	21-23/ „	1.70
	8.00	27/ „	24-26/ „	1.60
			„ „	
Nr. 9.	6.50	23/II	gemischte Kost	0.65
	6.40	27/ „	24-26/II	0.64
	6.20	2/III	27/II-1/III	0.62
	6.10	5/ „	2-4/ „	0.61
	6.30	23/ „	5-22/ „	0.95

Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des Adrenalins. 15

I. (a)

Vor der Injek- tion	Blutzuckergehalt (%)							Blutzucker- gehalt vor d. Injektion (A)	Maximaler Blutzucker- gehalt (B)	Hyper- glykämischer Quotient B/A
	½ St.	1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.			
	nach der Injektion									
0.084	0.112	0.106	0.104	0.101	0.091	—	—	0.083	0.103	1.24
0.082	0.095	0.092	0.076	0.073	0.085	—	—			
0.082	0.104	0.098	0.100	0.088	0.100	—	—			
0.088	0.096	0.109	0.114	0.097	0.093	—	—	0.083	0.119	1.43
0.082	0.098	0.113	0.113	0.126	0.117	—	—			
0.078	0.083	0.091	0.099	0.099	0.116	—	—			
0.083	0.102	0.102	0.104	0.118	0.121	0.108	0.083	0.085	0.150	1.76
0.083	0.118	0.143	0.144	0.160	0.155	0.143	0.109			
0.087	0.113	0.127	0.132	0.137	0.141	0.126	0.098			
0.085	0.114	0.107	0.107	0.098	0.091	0.083	0.078	0.089	0.116	1.30
0.082	0.106	0.111	0.116	0.118	0.113	0.108	0.078			
0.089	0.116	0.126	0.117	0.116	0.102	0.097	0.085	0.091	0.131	1.44
0.093	0.137	0.121	0.107	0.097	0.098	0.097	0.101			
0.087	0.140	0.126	0.126	0.105	0.099	0.094	0.086	0.089	0.141	1.58
0.091	0.142	0.123	0.104	0.115	0.107	0.096	0.093			
0.080	0.126	0.164	0.213	0.221	0.221	0.219	0.158	0.077	0.198	2.44
0.073	0.128	0.151	0.158	0.172	0.176	0.160	0.114			
0.091	0.160	0.148	0.140	0.127	0.121	0.108	0.100	0.094	0.183	1.95
0.096	0.204	0.206	0.181	0.160	0.149	0.115	0.097			
0.098	0.130	0.128	0.121	0.109	0.103	0.095	0.106	0.100	0.135	1.35
0.102	0.140	0.131	0.126	0.125	0.124	0.121	0.104			
0.104	0.131	0.132	0.128	0.144	0.118	0.111	0.123	0.104	0.147	1.41
0.104	0.140	0.151	0.137	0.128	0.137	0.138	0.116			
0.113	0.143	0.137	0.136	0.139	0.142	0.143	0.129	0.112	0.157	1.40
0.111	0.158	0.172	0.169	0.165	0.142	0.146	0.133			
0.114	0.176	0.194	0.189	0.177	0.158	0.154	0.146	0.114	0.194	1.70
0.109	0.176	0.156	0.153	0.159	0.152	0.143	0.126			
0.113	0.184	0.165	0.147	0.151	0.150	0.129	0.117	0.111	0.180	1.62
0.100	0.120	0.134	0.148	0.151	0.184	0.173	0.170	0.100	0.191	1.91
0.104	0.155	0.167	0.192	0.194	0.170	0.115	0.094			
0.097	0.141	0.176	0.195	0.181	0.175	0.148	0.125			
0.103	0.129	0.173	0.188	0.192	0.202	0.165	0.123	0.100	0.199	1.99
0.097	0.116	0.145	0.166	0.190	0.197	0.169	0.125			
0.103	0.155	0.184	0.207	0.212	0.220	0.213	0.181			
0.097	0.123	0.138	0.161	0.173	0.194	0.175	0.136	0.100	0.207	2.07
0.105	0.142	0.143	0.144	0.138	0.138	0.138	0.138			
0.100	0.130	0.137	0.141	0.143	0.148	0.144	0.128			
0.104	0.114	0.109	0.116	0.115	0.111	0.110	0.105	0.104	0.116	1.12
0.113	0.134	0.141	0.140	0.149	0.167	0.188	0.174	0.113	0.188	1.58
0.099	0.118	0.134	0.139	0.148	0.177	0.192	0.165	0.099	0.192	1.94
0.102	0.115	0.121	0.121	0.137	0.142	0.140	0.121	0.093	0.126	1.35
0.084	0.097	0.111	0.100	0.110	0.108	0.105	0.097			

TABELLE

Nr. des Hundes ♂	Körpergewicht (kg)	Datum	Nahrung	Dosis des Adrenalins 0.15 mg pro kg Körpergewicht
Nr. 10.	3.90	(1931) 25/II	gemischte Kost	0.60
	4.50	28/ "	25-27/II	0.68
	4.20	4/III	1-3/III	0.63
	3.95	7/ "	4-6/ "	0.60
	4.10	11/ "	9-10/ "	0.62
	4.20	14/ "	11-13/ "	0.63
	4.75	18/ "	16-17/ "	0.70
	4.60	21/ "	18-20/ "	0.70
			" "	
Nr. 11.	4.70	6/III	gemischte Kost	0.70
	4.70	10/ "	6-9/III	0.70
	4.60	13/ "	11-12/ "	0.70
	4.75	17/ "	13-16/ "	0.70
	4.80	20/ "	18-19/ "	0.72
	4.75	25/ "	20-24/ "	0.70
	4.90	28/ "	26-27/ "	0.74
	4.90	1/IV	28-31/ "	0.74
			" "	
Nr. 12.	5.90	29/VI	gemischte Kost	0.90
	5.90	2/VII	29/VI-1/VII	0.90
	6.05	6/ "	2-5/ "	0.90
	5.70	9/ "	7-8/ "	0.85
	5.95	13/ "	9-12/ "	0.90
	6.05	16/ "	13-15/ "	0.90
	6.35	20/ "	17-19/ "	0.95
	6.30	23/ "	20-22/ "	0.95
	6.60	27/ "	23-26/ "	1.00
	6.60	30/ "	27-29/ "	1.00
	6.45	3/VIII	31/VII-2/VIII	0.96
	6.35	6/ "	3-5/ "	0.95
			" "	
Nr. 13.	8.50	30/VI	gemischte Kost	1.27
	8.55	3/VII	30/VI-2/VII	1.28
	7.90	10/ "	8-9/ "	1.18
	8.75	14/ "	10-13/ "	1.30
	9.10	17/ "	14-16/ "	1.37
	9.75	24/ "	20-23/ "	1.46
	9.70	28/ "	24-27/ "	1.45
	9.10	31/ "	28-30/ "	1.36
	8.40	31/VIII	31/VII-30/VIII	1.26
	8.15	3/IX	31/VIII-2/IX	1.20
			" "	

Einfluss der Ernährung auf die Wirkung des Adrenalins. 17

I. (b)

Blutzuckergehalt (%)								Blutzucker- gehalt vor d. Injektion (A)	Maximaler Blutzucker- gehalt (B)	Hyper- glykämischer Quotient B/A
Vor der Injek- tion	½ St.	1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.			
nach der Injektion								(Durchschnittswert)		
0.093	0.094	0.098	0.106	0.118	0.112	0.103	0.104	0.098	0.132	1.35
0.103	0.147	0.132	0.133	0.136	0.131	0.115	0.107			
0.094	0.110	0.122	0.132	0.131	0.125	0.128	0.124	0.101	0.141	1.40
0.108	0.116	0.123	0.118	0.135	0.142	0.151	0.150			
0.103	0.134	0.142	0.140	0.141	0.135	0.121	0.122	0.110	0.154	1.40
0.116	0.139	0.143	0.157	0.164	0.166	0.150	0.133			
0.070	0.092	0.094	0.096	0.098	0.102	0.105	0.101	0.081	0.110	1.36
0.092	0.111	0.116	0.110	0.116	0.113	0.108	0.106			
0.089	0.115	0.117	0.125	0.119	0.111	0.107	0.098	0.088	0.117	1.33
0.086	0.093	0.105	0.106	0.110	0.101	0.097	0.087			
0.080	0.102	0.113	0.128	0.142	0.136	0.105	0.087	0.083	0.156	1.88
0.086	0.101	0.124	0.145	0.149	0.171	0.157	0.110			
0.088	0.090	0.105	0.114	0.134	0.157	0.178	0.131	0.086	0.159	1.85
0.084	0.096	0.106	0.125	0.129	0.140	0.141	0.113			
0.115	0.111	0.114	0.122	0.128	0.126	0.127	0.119	0.102	0.129	1.26
0.089	0.095	0.106	0.114	0.131	0.118	0.114	0.105			
0.093	0.110	0.115	0.135	0.128	0.128	0.120	0.117	0.089	0.140	1.57
0.085	0.121	0.123	0.131	0.131	0.129	0.116	0.100			
0.089	0.129	0.120	0.135	0.142	0.136	0.141	0.155	0.091	0.184	2.02
0.090	0.125	0.139	0.139	0.145	0.169	0.140	0.105			
0.090	0.127	0.143	0.165	0.202	0.210	0.183	0.143	0.096	0.177	1.84
0.094	0.112	0.142	0.148	0.151	0.162	0.175	0.148			
0.097	0.117	0.133	0.147	0.149	0.153	0.173	0.168	0.093	0.166	1.78
0.102	0.135	0.149	0.151	0.167	0.184	0.202	0.178			
0.094	0.140	0.148	0.167	0.164	0.165	0.162	0.124	0.093	0.166	1.78
0.091	0.120	0.135	0.149	0.167	0.166	0.165	0.141			
0.096	0.142	0.132	0.131	0.130	0.128	0.111	0.091	0.093	0.166	1.78
0.090	0.143	0.154	0.182	0.191	0.178	0.143	0.114			
0.095	0.104	0.127	0.127	0.117	0.116	0.111	0.105	0.093	0.132	1.42
0.090	0.108	0.118	0.119	0.137	0.135	0.107	0.103			
0.089	0.105	0.118	0.132	0.138	0.125	0.101	0.102	0.091	0.187	2.06
0.092	0.117	0.124	0.162	0.194	0.231	0.191	0.125			
0.093	0.117	0.150	0.185	0.189	0.193	0.172	0.118	0.094	0.192	2.04
0.099	0.170	0.180	0.186	0.186	0.175	0.147	0.117			
0.094	0.137	0.144	0.160	0.167	0.175	0.148	0.095	0.094	0.192	2.04
0.089	0.167	0.176	0.210	0.210	0.215	0.194	0.125			
0.094	0.105	0.143	0.147	0.119	0.101	0.094	0.096	0.090	0.155	1.72
0.086	0.119	0.154	0.158	0.163	0.161	0.129	0.091			

Körpergewicht der Tiere keine bedeutende Schwankung erfuhr. Dies waren ungefähr 50 Kal. pro kg Körpergewicht. In jeder Ernährungsperiode, die in der Regel wenigstens eine Woche dauerte, wurde den Tieren nach 24stündigem Fasten 0,1–0,21 mg Adrenalin (Sankyo) pro kg Körpergewicht in der Verdünnung von 1:1000 subkutan am Rücken eingespritzt, und die danach eintretende Blutzuckersteigerung halbstündlich bis fünf Stunden lang nach Bangs Mikrobestimmungsmethode untersucht. Mit einer Ausnahme (Nr. 9) wurde dieselbe Untersuchung regelmässig wenigstens zweimal in jeder Ernährungsperiode ausgeführt. Bei Nr. 1 und 4 wurde die nach dem Körpergewicht berechnete Adrenalinmenge (0,75 bzw. 1,00 mg d. h. 0,19 bzw. 0,21 mg pro kg Körpergewicht) im weiteren Verlauf der Experimente unverändert gelassen; in allen anderen Fällen wurde sie von Fall zu Fall, je nach dem veränderten Körpergewicht, neu bestimmt. Um einen etwaigen Einfluss der vorangegangenen Adrenalininjektion auf die Wirkung der nächstfolgenden möglichst auszuschalten, wurde zwischen je zwei Injektionen ein Intervall von mindestens drei Tagen eingefügt. Die einzelnen Daten sind in der Tabelle I zu sehen.

Wie die Tabelle zeigt, stimmten die Versuchsergebnisse bis auf einige Schwankungen im grossen und ganzen ziemlich gut überein. In allen Fällen tritt die Hyperglykämie in den kohlenhydratarm bzw. mit Eiweiss-Fett ernährten Perioden stärker und länger dauernd (im Sinne der deutlichen Plateaubildung der Blutzuckerkurve) zutage, wie in den kohlenhydratreich bzw. mit gemischter Kost ernährten. In den meisten Fällen scheint der maximale Blutzuckerwert bei der Hyperglykämie der ersteren Periode etwas später erreicht zu werden als bei der letzteren. Die Hyperglykämie kommt bei der Fettdiät deutlich stärker zum Vorschein als bei der Eiweissdiät. Zwischen der Eiweiss- und Eiweiss + Fettdiät ist kein ausgesprochener Unterschied dieser Reaktion zu konstatieren. Bei fünf von neun Tieren flacht die hyperglykämische Kurve in der letzten Periode gemischter Kost wieder ab, um sich der Kurve der ersten zu nähern. Dieses Verhalten der Hyperglykämie in den verschiedenen Ernährungsperioden ist am leicht-

esten in der Kolonne des Durchschnittswertes sowohl des hyperglykämischen Quotienten wie auch des maximalen Blutzuckergehaltes in Tabelle I zu erkennen. Bei dieser Versuchsanordnung zeigt der Blutzuckerwert vor der Injektion des Adrenalins keine nennenswerte Abhängigkeit von der vorangehenden Ernährungsweise. Auch in der Periode mit gemischter Kost, wo der gesteigerte Blutzucker nach Adrenalin in relativ kürzerer Zeit wieder auf den Ausgangswert zurückzukehren pflegt, kann man keine deutliche hypoglykämische Phase nach der Hyperglykämie konstatieren, soweit die Untersuchung ausgeführt wurde.

Da aber die hyperglykämisierende Wirkung des Adrenalins nach wiederholter Zufuhr desselben je nach den Versuchsbedingungen sich verschieden zu verhalten scheint (Waltermann, 1911; Garnier u. Schulmann, 1914; Hildebrandt, 1920 und Stenstrom), wurde bei meiner Untersuchung als Kontrolle bei Tieren, die ununterbrochen kohlenhydratreich mit gemischter Kost genährt worden waren, die Blutzuckersteigerung nach Adrenalininjektion untersucht. Dabei blieb, abgesehen von der Ernährungsweise, die Versuchsanordnung genau dieselbe wie beim Hauptversuche.

Aus Tabelle II kann man ersehen, dass während der ganzen Versuchsdauer die Blutzuckersteigerung ausnahmslos keine Neigung zur Zu- oder Abnahme zeigt, wenngleich geringfügige Schwankungen nicht vermieden werden können.

Nach diesen Ergebnissen unterliegt es also keinem Zweifel, dass bei der Eiweiss-Fettdiät die blutzuckersteigernde Wirkung des Adrenalins stärker in Erscheinung tritt als bei kohlenhydratreicher gemischter Kost; mit anderen Worten: die genannte Wirkung des Adrenalins wird in hohem Masse von der Ernährung beeinflusst, was der Angabe von Abderhalden und Wertheimer entspricht. Diese Erscheinung fällt bei der Fettdiät deutlicher ins Auge als bei der Eiweissdiät.

II. ÜBER GLYKOGEN.

Wie oben bemerkt, ist es wohl bekannt, dass die Blutzuckersteigerung nach Adrenalinzufuhr von einer Verminderung des

TABELLE II.

Nr. des Hundes	Körpergewicht (kg)	Datum	Dosis des Adrenalins (0,15 mg pro kg Körpergewicht)	Vor der Injektion	Blutzuckergehalt (%) nach der Injektion						Maximaler Blutzuckerwert	Hyperglykämischer Quotient
					1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.		
					1 St.	1½ St.	2 St.	3 St.	4 St.	5 St.		
Nr. 7.	7.10	(1930) 11/XI	1.40	0.094	0.116	0.127	0.146	0.154	0.131	0.129	0.090	1.64
	6.55	14/ "	1.30	0.101	0.130	0.141	0.153	0.161	0.151	0.134	0.154	1.59
	6.35	18/ "	1.30	0.092	0.124	0.131	0.141	0.147	0.135	0.108	0.100	1.60
	6.05	21/ "	1.20	0.114	0.141	0.144	0.144	0.163	0.162	0.151	0.132	1.43
Nr. 8.	8.40	(1931) 10/XI	1.26	0.096	0.127	0.177	0.214	0.195	0.176	0.177	0.159	2.23
	8.70	13/ "	1.30	0.094	0.115	0.154	0.164	0.184	0.192	0.165	0.114	2.05
	8.60	20/ "	1.30	0.092	0.143	0.183	0.184	0.195	0.178	0.145	0.110	2.13
	8.40	24/ "	1.26	0.095	0.118	0.144	0.177	0.179	0.179	0.150	0.129	1.88
	8.30	1/XII	1.25	0.097	0.157	0.184	0.194	0.187	0.171	0.156	0.116	2.00
Nr. 15.	5.10	(1931) 9/XI	0.76	0.116	0.135	0.159	0.147	0.150	0.147	0.143	0.111	1.37
	5.05	12/ "	0.75	0.111	0.137	0.145	0.147	0.159	0.150	0.142	0.122	1.43
	5.10	16/ "	0.76	0.113	0.134	0.151	0.163	0.161	0.159	0.130	0.110	1.44
	5.45	19/ "	0.80	0.116	0.122	0.131	0.124	0.111	0.118	0.112	0.101	1.13
	5.30	26/ "	0.80	0.111	0.145	0.147	0.149	0.145	0.144	0.120	0.122	1.34
Nr. 16.	5.70	(1931) 9/XI	0.85	0.101	0.137	0.144	0.135	0.127	0.125	0.104	0.108	1.43
	5.60	12/ "	0.84	0.105	0.125	0.141	0.141	0.155	0.157	0.130	0.115	1.50
	5.70	16/ "	0.85	0.103	0.113	0.138	0.132	0.136	0.139	0.131	0.132	1.35
	5.50	19/ "	0.82	0.092	0.128	0.132	0.136	0.142	0.146	0.130	0.109	1.58
	5.40	26/ "	0.80	0.104	0.148	0.140	0.138	0.140	0.129	0.116	0.109	1.42

Leberglykogens begleitet ist. Aber dafür, dass der bei Adrenalininjektion im Blute bzw. im Harn auftretende Zucker ausser aus der Leber auch aus dem Muskelglykogen stammen könne, haben zuerst Gatin-Gruzewska und Agadschanianz plädiert, da sie bei Kaninchen nach einer Hungerperiode und nach Adrenalinbehandlung das Muskelglykogen auch, und zwar gelegentlich sogar in höherem Masse vermindert fanden als das Leberglykogen. In neuerer Zeit (1925) ist hierfür besonders Ohara eingetreten: er führt zugunsten dieser Auffassung an, dass auch noch bei Tieren, deren Leberglykogen durch Hunger völlig geschwunden ist, Adrenalin hyperglykämisierend wirkt, wie auch Bang und andere gefunden hatten, und das Muskelglykogen über das Mass des durch Hunger allein erreichbaren Grades vermindert, ferner dass auch nach vollständiger Ausschaltung der Leber Adrenalin hyperglykämisierend wirkt, und das Muskelglykogen sich vermindert. Alle diese Ergebnisse entsprechen der Behauptung von Oka.

Andererseits fanden aber Frank und Isaac (1909) bei Kaninchen und Michaud (1911) bei Hunden, dass mit Phosphor vergiftete Tiere keine Hyperglykämie nach Adrenalininjektion aufweisen. Vandeput (1910), sowie Falta und Priestley (1911) konnten durch Verfahren nach Porges nach vollkommener Ausschaltung der Leber keine wesentliche oder überhaupt keine Blutzuckersteigerung durch Adrenalin erreichen. Ebenso gelang es Velich (1906) bei entlebten Fröschen nicht Adrenalindiabetes hervorzurufen. Michaud vermochte auch nach Anlegung einer Eckschen Fistel meist keine oder keine ausgesprochene Adrenalinhyperglykämie zu verursachen. Alle diese Versuchsergebnisse lassen uns die alleinige Bedeutung der Leber für die Adrenalinhyperglykämie annehmen.

Diese Angaben scheinen also keine eindeutige Grundlage zur Beantwortung der Frage nach der Herkunft des im Adrenalindiabetes ausgeschiedenen Zuckers zu liefern und lassen die Frage noch offen, ob nicht auch andere Stoffe als Kohlenhydrate, insbesondere Fette, den bei der Adrenalinwirkung in die Zirkulation geworfenen Zucker zu bilden vermögen, wenn Glykogen nicht zur Verfügung steht (Blum, Velich, Roubizschek, 1914;

Laufberger, 1924; Junkersdorf und Török, 1926; Wertheimer, 1926; Störing, 1929, etc.). Voriges Jahr teilten Fuentes, Duomarco und Numilla (1931) mit, dass Hyperglykämie und Glykosurie trotz fast völliger Entglykogenisierung der Leber als Folge der Gallenstauung durch Choledochusunterbindung eintreten, und dass die Leber dieser ikterischen Tiere ihre Fähigkeit behält, die Menge an Neoglukose zu erzeugen, die notwendig ist, um die Adrenalinhyperglykämie hervorzurufen und aufrecht zu erhalten, auf Kosten anderer Substanzen des intermediären Stoffwechsels, deren Natur noch zu erforschen ist. Die Wirkung des Adrenalins in dieser Richtung bedarf also noch weiterer Untersuchung. Zu vorliegendem Versuch wurde vorläufig das Glykogen sowohl der Leber als auch des Muskels bei den erwähnten verschiedenen Ernährungsweisen vergleichend untersucht, um zu sehen, in welchem Verhältnis die Glykogendepots des Organismus zur Reaktion auf Adrenalin stehen.

Die Untersuchungen wurden an vier Gruppen Hunden angestellt, welche mindestens drei Tage lang je nach der Gruppe kohlenhydratreich, mit Eiweiss, Eiweiss+Fett bzw. Fett ernährt worden waren. Mindestens drei Tage nach der letzten Adrenalininjektion und gleichzeitig nach 24stündigem Fasten wurden die Tiere durch künstliche Luftembolie getötet, und so schnell wie möglich der Glykogengehalt der Leber und des Muskels (*Quadriceps femoris*) nach Mori-Iwasaki(1922) bestimmt. Alle Untersuchungsbedingungen, auch hinsichtlich der Adrenalinzufuhr, wurden hier selbstverständlich genau in derselben Weise eingestellt, wie bei den vorangegangenen Versuchen. Nur dass am selben Tiere der Glykogengehalt vor der Adrenalininjektion und der Blutzuckergehalt nach derselben nicht bestimmt werden können, lässt sich nicht ändern. Bei der diesbezüglichen Untersuchung stellen also die Versuchsergebnisse den Glykogengehalt dar, der in der Leber in dem Zeitpunkt enthalten ist, wo das Adrenalin zugeführt werden muss. Die Untersuchungsergebnisse sind in Tabelle III gezeigt.

Der Kürze und Übersichtlichkeit halber werden die Mittelwerte aller Resultate noch einmal in der folgenden Tabelle IV zusammengestellt, die eine neue Kolonne des Glykogengehaltes der

TABELLE III.

Datum	Nr. des Hundes	Körpergewicht (kg)	Nahrung	Blutzucker-gehalt (%) vor der Tötung	Lebergewicht (g)	Glykogen-gehalt (%)	
						der Leber	des Muskels
(1931)							
7/XII	14.	9.35	gemischte Kost	0.095	338.5	2.90	2.12
8/ "	13.	5.50	" "	0.067	235.5	3.84	2.32
10/ "	8.	8.15	" "	0.094	277.0	3.05	2.05
11/ "	16.	5.10	" "	0.095	249.5	4.50	2.57
(1932)							
2/II	27.	6.80	" "	0.095	311.5	1.15	0.81
				im Mittel		3.08	1.97
(1931)							
14/XII	17.	5.20	11-13/XII Eiweiss - Kost	0.087	254.0	3.28	2.20
18/ "	18.	6.20	12-17/ " " "	0.099	204.0	2.95	1.94
21/ "	19.	5.00	14-20/ " " "	0.122	245.5	1.85	1.25
22/ "	20.	4.60	15-21/ " " "	0.118	234.5	1.83	1.18
24/ "	21.	5.70	15-23/ " " "	0.091	224.5	1.46	1.14
(1932)							
17/II	35.	11.30	10-16/II " "	0.077	391.5	1.02	0.76
24/ "	42.	5.50	17-23/ " " "	0.062	190.0	0.98	0.67
				im Mittel		1.91	1.30
(1931)							
25/XII	22.	4.55	16-17/XII Eiweiss - Kost	0.108	211.0	1.24	1.17
28/ "	23.	5.10	18-24/ " Eiweiss + Fett - K.	0.102	175.0	1.08	0.85
			23-27/ " Eiweiss + Fett - K.				
(1932)							
7/ I	24.	5.90	23/XII-6/I Eiweiss + Fett - K.	0.089	226.0	1.16	0.62
8/ "	25.	4.90	23-24/XII Eiweiss - K.	0.109	240.5	0.67	0.58
21/ "	26.	6.30	25/XII-7/I Eiweiss + Fett - K.	0.084	268.0	1.35	0.83
			11-12/ I Eiweiss - K.				
20/II	38.	15.70	13-20/ " Eiweiss + Fett - K.	0.087	585.0	1.05	0.74
			13-16/II Eiweiss - K.				
23/ "	39.	8.70	17-19/ " Eiweiss + Fett - K.	0.063	236.0	1.04	0.77
			16-19/II Eiweiss - K.				
23/ "	40.	5.20	20-22/ " Eiweiss + Fett - K.	0.066	161.0	0.85	0.67
			16-19/ " Eiweiss - K.				
				im Mittel		1.05	0.78
(1932)							
5/II	28.	4.90	23/I-1/II Eiweiss - K.	0.091	218.0	0.63	0.61
5/ "	29.	5.00	2- 4/II Fett - K.	0.099	197.0	0.65	0.53
			23/I-1/II Eiweiss - K.				
11/ "	32.	7.00	2- 4/II Fett - K.	0.090	191.0	0.74	0.68
			4- 7/ " Eiweiss - K.				
13/ "	34.	3.70	8-10/ " Fett - K.	0.077	134.5	0.65	0.51
			6- 9/ " Eiweiss - K.				
19/ "	36.	21.30	10-12/ " Fett - K.	0.073	620.0	0.60	0.54
			12-15/ " Eiweiss - K.				
				im Mittel		0.65	0.57

TABELLE IV.

Zahl der Versuchs- hunde	Ernährungs- weise	Mittelwert des Glykogengehaltes		
		der Leber		des Muskels
		(%)	(g) pro kg Körpergew.	(%)
5	gemischt	3.08	1.29	1.97
7	Eiweiss	1.91	0.81	1.30
8	Eiweiss + Fett	1.05	0.40	0.78
5	Fett	0.65	0.22	0.57

Leber pro kg Körpergewicht enthält und keiner weiteren Erklärung bedarf.

RESUMÉ.

Die Blutzuckersteigerung nach Adrenalininjektion fällt bei kohlenhydratarmer bzw. Eiweiss-Fettdiät eher stärker und länger dauernd aus als bei kohlenhydratreicher gemischter, d. h. in dem Sinne, dass dort der von der Blutzuckerkurve begrenzte Flächenraum im Koordinatensystem weit grösser ist als hier. Unter den kohlenhydratarmen Ernährungsweisen erscheint die Hyperglykämie bei Fettnahrung stärker als bei Eiweissnahrung, aber zwischen der Eiweiss- und Eiweiss+Fettnahrung ist keine merkliche Differenz dieser Reaktion nachzuweisen. Der maximale Blutzuckerwert kommt meistens bei kohlenhydratarmer Diät etwas später zum Vorschein, als bei den sonstigen Diätweisen. Der Glykogengehalt sowohl der Leber als auch des Muskels ist bei kohlenhydratreicher Ernährung weit grösser als bei den anderen, und zwar nimmt er in folgender Reihenfolge ab: kohlenhydratreiche, Eiweiss-, Eiweiss+Fett- und Fettnahrung. Die Leber enthält bei einem und demselben Tiere in allen Fällen, also unabhängig von der Ernährungsweise, mehr Glykogen als der Muskel. Das Muskelglykogen nimmt, wenn auch in etwas geringerem Masse, annähernd parallel mit dem der Leber ab bzw. zu. Bei der Fettnahrung ist aber deshalb die absolute Differenz zwischen dem Glykogengehalt der beiden Organe sehr geringfügig.

Wenn man die Ergebnisse beider Versuchsreihen zusammenfassend betrachtet, so ist es auffallend, dass unter dieser Bedingung die Hyperglykämie nach Adrenalinzufuhr bei kohlenhydratarmer bzw. Eiweiss-Fett-Ernährung, wo der Organismus an Glykogenbestand deutlich verarmt, eher stärker zutage tritt als bei kohlenhydratreicher Ernährung mit reichlicheren Glykogendepots. Zwischen der Hyperglykämie nach Adrenalin und dem Glykogenbestand des Organismus ist also kein direkter Parallelismus im quantitativen Sinne des Wortes nachzuweisen. Mit anderen Worten: diese Wirkung des Adrenalins wird durch die Ernährung deutlich beeinflusst, was um so auffallender ist, als der Glykogenbestand dabei für das Zustandekommen der Adrenalinhyperglykämie keine ausschlaggebende Rolle spielt. Die Ursache dieser Erscheinung muss folgerichtig in einer anderen Richtung gesucht werden. Ich neige zu der Ansicht, dass diese modifizierte Reaktion auf Adrenalinzufuhr u. U. wenigstens zum Teil auf eine gewisse Veränderung, sozusagen eine Art Umstimmung, der Erfolgsorgane zurückgehen mag, die durch einseitige Ernährung hervorgerufen worden sein kann. Das ist aber noch weiter zu erforschen. Die anfangs aufgeworfene Frage, wie das Glykogen des Muskels überhaupt an der Adrenalinhyperglykämie beteiligt sein mag, und wie der Zucker aus Nichtkohlenhydraten bei kohlenhydratarmem Zustande durch Adrenalininjektion gebildet werden könnte, bleibt zur Zeit noch offen.

Zum Schlusse erfülle ich die angenehme Pflicht, Herrn Prof. N. Kageura, auf dessen Veranlassung diese Arbeit zustande gekommen ist, für seine Leitung und Unterweisung meinen ergebensten Dank auszusprechen.

LITERATUR.

- Abderhalden, E. u. Wertheimer, E. (1924): Pflügers Arch., **205**, 546.
 Agadschanianz, K. (1907): Biochem. Zeitschr., **2**, 148.
 Asakawa, O. (1920): Mitteil. d. med. Fakul. d. Kaiserl. Universität zu Tokyo, **25**, 539.
 Bang, I. (1913): Der Blutzucker, Wiesbaden.
 Barrenscheen, H. (1914): Biochem. Zeitschr., **58**, 277.
 Biberfeld, J. (1919): Arch. exp. Pathol. u. Pharmak., **84**, 360.

- Blum, F. (1902): Pfügers Arch., **90**, 617.
- Collens, W. S., Shelling, D. H. u. Byron, C. S. (1926): Proc. soc. exp. biol. and med., **23**, 361 u. 545. zit. nach Bayer, Handb. d. inn. Sekretion, Leipzig, **2**, Hälft. 1., 1929.
- Doyon, M. u. Kareff, N. (1904): Compt. rend. Soc. Biol., **56**, 66. zit. nach Bang.
- Drummond, W. B. u. Paton, D. N. (1904): Journ. Physiol., **31**, 92.
- Embden, G.: zit. nach Isaac u. Siegel, Handb. d. normal. u. pathol. Physiol., Berlin, **5**, 513, 1928.
- Falta, W. u. Priestley, J. G. (1911): Berlin. klin. Wochenschr., **48**, 2102.
- Frank, E. u. Isaac, C. (1909): Zeitschr. exp. Pathol. u. Ther., **7**, 326. zit. nach Bang.
- Fuentes, B., Duomarco, J. und Numilla, A. (1931): Zeitschr. exp. Med., **75**, 577.
- Gatin-Gruzevska, Z. (1906): Compt. rend Acad. Scien., **142**, 1165. zit. nach Bang und Bayer.
- Garnier, M. u. Schulmann, E. (1914): Compt. rend. Soc. Biol., **76**, 287. zit. nach Bayer.
- Hildebrandt, F. (1920): Arch. exp. Pathol. u. Pharmak., **88**, 80.
- Herter, C. A. u. Richards, A. N. (1902): N. Y. Med. News, **80**, 201. zit. nach Biberfeld.
- Ikeziri, K. (1926): Vortrag in d. japan. Gesellsch. f. inn. Med. in Tokyo.
- Ikushima, T. (1929): Journ. Gastroenterology, **4**, 1310.
- „ (1930): ebenda **5**, 38.
- Iwao, C. (1932): Vortrag von Prof. Tsunoo in der japan. Gesellsch. f. Verdauungskr. in Nagoya.
- Iwasaki, T. u. Mori, M. (1922): zit. n. Suto, Praktikum d. physiol. Chemie, 11. Aufl. Tokyo, 234.
- Junkersdorf, P. u. Török, P. (1926): Pfügers Arch., **211**, 414.
- Kageura, N. (1922): Journ. Biochem., **1**, 333. I. Mitteil.
- „ (1924): ebenda **3**, 457. V. Mitteil.
- Kinoshita, T. (1926): Nippon Naika Gakkai Zasshi (Mitteil. d. japan. Gesellsch. f. inn. Med.), **14**, 443.
- Laufberger, W. (1924): Klin. Wochenschr., **3**, 264.
- Markowitz, J. (1925): Amer. Journ. Physiol., **74**, 22.
- Michaud (1911): Verhandl. d. deutsch. Kongr. f. inn. Med., Wiesbaden. zit. nach Bang.
- Ohara, T. (1925): Tohoku Journ. exp. Med., **6**, 1 u. 23.
- Oka, T. (1922): ebenda **3**, 206.
- Pollak, L. (1909): Arch. exp. Pathol. u. Pharmak., **61**, 149.
- Ritzmann, H. (1909): ebenda **61**, 231.
- Roubitzschek, R. (1914): Pfügers Arch., **155**, 68.
- Staub, H. (1922): Zeitschr. klin. Med., **93**, 123.
- Stenstrom, T.: zit. nach Bayer.

- Störriug, G. (1929): Pflügers Arch., **221**, 282.
Susaki, K. (1926): La Iji-Sinbun, Nr. 1201, 1443.
Vandeput, E. (1910): Arch. internat. Physiol., **9**, 292. zit. n. Bayer.
Velich, A. (1906): Virchows Arch., **184**, 345.
Waltermann, N. (1911): Zeitschr. physiol. Chem., **74**, 273.
Wertheimer, E. (1926): Pflügers Arch., **213**, 298.
Wolownik, B. (1905): Virchows Arch., **180**, 225.
Yoshida, K. (1930): Buleteno de la Jurmedica Instituto de la Medicina
Fakultato de Nagasaki, **2**, 132.

EINFLUSS DER GALLENSÄURE AUF DEN CALCIUM-STOFFWECHSEL IV.

Veränderungen im Kalkzustand durch Zufuhr von Gallensäure bei normaler sowie thyreoparathyreopriver Hündin.

VON

TADAO HOSIZIMA.

(Aus dem physiologisch-chemischen Institut, Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 17. September 1932)

Nach Sekitoo (1930) soll der Kalkgehalt im Harn und Blut durch Zufuhr von Cholsäure oder durch Anbringen des experimentellen Stauungsikterus bei Kaninchen gesteigert werden. Weiter hat er dabei beobachtet, dass sich das Ca im Blut bei Verlust von Gallensäure aus dem Organismus, bzw. durch Ableitung der Galle nach aussen aus der Gallenblasenfistel vermindert. Nach King und Stewart (1909), Davidson und Emerson (1927) aber wird beim Stauungsikterus oder bei Zufuhr von Galle der Kalkgehalt des Blutes gesteigert. Nach Fuziwara (1931) und Okii (1932) soll das Ca im Kot durch Zufuhr von Cholsäure vermindert werden. Kawada (1931) hat beobachtet, dass es in der Galle des Hundes dadurch vermehrt wird. Die oben angeführten Daten zeigen, dass der Calciumstoffwechsel mit der Gallensäuremenge im Organismus in inniger Beziehung steht. Nach Zondek (1929) sollen die Veränderungen der Elektrolytenmenge in Geweben und Organen mit der Funktion der diese innerverierenden vegetativen Nerven eng verknüpft sein. Liegt eine derartige Konzentrationsänderung der Ionen durch die Funktion des vegetativen Nervensystems vor, so könnten die Ionen im Blut auch durch die verschiedenen Hormone beeinflusst werden, die ja die Funktion der vegetativen Nerven stark beeinflussen.

Über den Zusammenhang zwischen der Funktion des vege-

tativen Nervensystems und der Wirkung der Gallensäure haben schon Tsuji (1930), Sekitoo (1930), T. Okamura (1928) und Taku (1928) Studien gemacht und gefunden, dass die Gallensäure zu dem Adrenalin antagonistisch wirkt, indem sie auf den Sympathicus lähmend und auf den Vagus reizend einwirkt. Nach Kitayama (1927) soll das Zuckerzentrum für den Calciumstoffwechsel eine grosse Rolle spielen, indem es die Ausschüttung des Adrenalins aus der Nebenniere unter Vermittelung der N. splanchnici bewirkt. Daher muss der Calciumgehalt im Blut durch Zufuhr von Adrenalin oder durch die Piqure vermindert werden. Wollheimer (1929) behauptet, dass der sympathische Reiz zu einer Calciumkonzentrierung, der vagische zu einer Calciumverdünnung im Gewebe führt, und dass die durch die vegetative Nervenfunktion ausgelöste Verteilungsänderung der Elektrolyte in den Geweben Wasserverschiebung bewirke, durch die die Funktion der Organe und Gewebe stark beeinflusst wird. Aus den oben angeführten Daten geht hervor, dass zwischen dem Calciumstoffwechsel und der vegetativen Nervenfunktion eine innige Beziehung besteht, welche letztere mit den innersekretorischen Substanzen unverkennbar eng verknüpft ist. Im oben erwähnten Sinne ist es von Bedeutung, den Einfluss der Gallensäure mit anderen Hormonen auf den Calciumstoffwechsel zu untersuchen, da die Gallensäure auch eine hormonale Wirkung hat.

Es ist allgemein bekannt, dass das Hormon aus der Nebenschilddrüse, Parathormon nach Collip (1925) mit dem Calciumstoffwechsel und mit der sympathischen Nervenfunktion in innigem Zusammenhang steht. Es ist auch allgemein anerkannt, dass die Tetanie der parathyreoopriven Tiere unter im Serum stark vermindertem Kalkspiegel hervorgerufen wird, indem nach Rominger und Meyer (1930), Robison und Soames (1924) die Kalkanlagerung in den Knochen vermehrt wird. Nach Waltner (1928), Greenwald und Gross (1928) soll aber diese Hormonwirkung unter höherem Kalkspiegel im Serum und stark erhöhter Kalkausscheidung im Harn Calciumphosphat aus den Knochen auslösen. Hess, Lewis und Rivikin (1928) haben zuerst gefunden, dass die überschüssige Zufuhr von bestrahltem Ergosterin

eine Hypercalcämie herbeiführt. Über das Wesen der Hypercalcämie sind die Meinungen je nach den Autoren, wie Demole und Christ(1929), und Bischoff(1930) Holtz und Schreiber (1930), Jones, Rapoport und Hodes (1930), Greenwald und Gross (1928), Jones (1926) ganz verschieden, indem einerseits das Ergosterin die vermehrte Sekretion des Parathormons herbeiführen, andererseits dagegen nicht auf die Tetanie von parathyreopriven Tieren wirken soll. Nach Hess, Weinstock und Rivikin (1930), Hess, Benjamin und Gross (1931) soll die Hypercalcämie bei Überzufuhr von bestrahltem Ergosterin aus den Knochen herkommen. Nach Higashi(1931) wird die hypercalcämisch wirkende Gallensäure in der Galle des Hundes durch Zufuhr von bestrahltem Ergosterin vermehrt. Daher ist es interessant, die Beziehung zwischen den beiden Wirkungen, der von bestrahltem Ergosterin und der von Gallensäure, zu erforschen, und das Verhalten der Gallensäure gegen die Tetanie klarzustellen. Betreffend die Beziehung zwischen Thyroxin und autonomem Nervensystem wurde von Kraus und Friedenthal(1908), Eppinger (1908) und Cori (1921) bewiesen, dass Thyroxin auf den Sympathicus reizend wirkt. Es ist interessant die Wirkung von Gallensäure und Thyroxin zu untersuchen, weil sie beide mit dem Kohlehydratstoffwechsel in inniger Beziehung stehen.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Zum Versuch wurde eine ausgewachsene Hündin benutzt. Die Hündin wurde immer mit folgender Nahrung gefüttert: Reis 300 g, trockne Fischchen 100 g, und etwas Shoyu aus Bohnen. Ausserhalb der Versuchszeit wurde sie mittags gefüttert; am eigentlichen Versuchstag wurde ihr nichts gegeben. Während der Versuchsperiode wurde die Hündin ganz ruhig in einem Käfig gehalten. Das Blut, 6–7 ccm, wurde an der V. saphena mittels der Rekordspritze entnommen, und das Serum in üblicher Weise bereitet. Der Harn wurde im Intervall von 1–2 Stunden durch Katheterisieren ausgelassen und unter Ansäuerung mit verdünnter Essigsäure abfiltriert, 5 ccm davon wurden für die Calciumbestim-

mung verwendet. Der Kalkgehalt im Blut und im Harn wurde nach der von Inouye (1922) modifizierten Methode von De Waad bestimmt. Die Feststellungen wurden jedesmal doppelt ausgeführt.

1. Versuch bei wiederholter Blutentnahme.

Aus den Tabellen I und II ist ersichtlich, dass der Calciumgehalt des Blutes der normalen Hündin 8.68–12.57 mg%, durchschnittlich 11.0 mg%, beträgt. Die Blutentnahme geschah im Intervall von 1–2 Stunden. Die jeweils folgende Blutentnahme zeigte eine kleine Verminderung des Kalkgehalts des Blutes, die innerhalb 0.5 mg% liegt. Der Verminderungsgrad ist je nach dem

TABELLE I.
Bei wiederholter Blutentnahme.

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Zu- bzw. Abnahme %	Datum	Harn-Ca mg
1	12/II				
	8.00	8.68			
	10.00	8.41	–3.11		
	12.00	8.09	–6.80		
2	2/III				
	10.05	10.98		8.00–10.00	6.68
	12.05	10.58	–3.64	12.00	5.25
	2.05	10.18	–7.29	2.00	3.46
				4.00	2.87
3	7/III				
	8.50	11.59		7.45–8.45	2.53
	9.50	11.10	–4.23	10.45	4.50
	11.50	10.80	–6.82	12.45	4.41
	1.50	10.51	–9.32	2.45	3.89
				4.45	2.64
4	9/III				
	9.35	10.14		8.30–9.30	5.32
	10.35	10.16	0.20	11.30	8.88
	12.35	10.05	–0.89	1.30	7.28
	2.35	9.82	–3.16	3.30	5.44
				5.30	3.48
5	10/III				
	9.05	10.80		8.00–9.00	4.31
	10.05	10.80	–0.92	10.00	2.96
	12.05	10.09	–7.43	12.00	4.44
	2.05	9.97	–9.15	2.00	3.96

Tiere verschieden. Dieses Resultat stimmt gut mit dem von Sekitoo überein, das er bei Kaninchen beobachtete. Auch nimmt die Kalkausscheidung im Harn bei fortlaufender Blutentnahme allmählich ab, wie in der Tabelle I angegeben ist.

2. Versuch bei Zufuhr von Cholsäure.

Bei diesem Versuch wurden der Hündin 0.7 cem einer 1%igen Natriumcholatlösung pro kg Körpergewicht intravenös injiziert, und vor und nach der Zufuhr im Zeitintervall von 1–2 Stunden der Calciumgehalt des Blutes und des Harns bestimmt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle II zusammengefasst. Aus der Tabelle II lässt sich ersehen, dass schon nach der ersten Stunde nach der Zufuhr von Cholsäure der Calciumgehalt des Blutes gesteigert wird. In den Fällen Nr. 4 und Nr. 5 hat der Kalkspiegel nach zwei Stunden sein Maximum erreicht. Der hypercalcämische Wert bei peroraler Zufuhr von Cholsäure erreicht sein Maximum 3–4 Stunden nach der Zufuhr, wie Sekitoo beobachtet hat. Die Calciumausscheidung im Harn vermehrt sich im allgemeinen 2–4 Stunden nach der Zufuhr der Cholsäure, um dann wieder zum Anfangswert abzusteigen, wie in der Tabelle II angegeben ist.

TABELLE II.
Bei Zufuhr von Cholsäure.

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
1			24/II 8.30– 9.30	0.63	← Cholatlösung
			11.30	3.15	
			1.30	1.22	
2	28/III 9.57	11.45	8.52– 9.52	5.37	← Cholatlösung
	11.57	11.85	11.52	9.49	
	1.57	12.44	1.52	11.84	
			3.52	7.78	
			5.52	6.81	

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
3	29/III 9.40	12.14	24/II 8.35- 9.35	2.86	← Cholatlösung
	10.40	12.63	10.35	1.79	
	12.40	12.75	12.35	5.59	
	2.40	12.72	2.35	4.54	
			4.35	3.62	
			6.35	3.28	
4	21/III 9.55	11.94	8.50- 9.50	4.05	← Cholatlösung
	11.55	13.12	11.50	5.39	
	1.55	11.75	1.50	4.28	
			3.50	4.11	
5	16/III 9.55	12.57	8.50- 9.50	1.14	← Cholatlösung
	11.55	12.77	11.50	0.96	
	1.55	12.37	1.50	0.80	
			3.50	0.77	
6	25/III 9.15	10.43	8.10- 9.10	4.46	← Cholatlösung
	11.15	11.61	11.10	13.45	
	1.15	10.91	1.10	—	
			3.10	10.10	
7	1/IV 8.45	11.12	7.50- 8.50	1.85	← Cholatlösung
	10.45	11.88	10.50	1.62	
	12.45	11.37	12.50	2.45	
			2.50	1.55	
			4.50	0.97	
8	3/IV 8.45	10.11			← Cholatlösung
	9.45	10.69			
	11.45	10.82			
	1.45	10.41			

3. Versuch bei Zufuhr von Cholsäure bei thyreoparathyreoidektomierter Hündin.

Die Thyreoparathyreoidektomie geschah nach Hammarsten. Der tetanische Anfall tritt 3–5 Tage nach der Operation auf. Das Auftreten der Tetanie war je nach den Tieren ganz verschieden, und der Blutkalkspiegel diente nicht immer als ein Zeichen des Tetanieausbruchs. Nach der Thyreoparathyreoidektomie wurden der Hündin 0.7 cem einer 1%igen Cholatlösung pro kg intravenös verabreicht, und vor und nach der Zufuhr wurde das Ca des Blutes und des Harns bestimmt.

TABELLE III.

Bei Zufuhr von Cholsäure bei thyreoparathyreoidektomierten Hündinnen.

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
1	22/V				Operation
	23/V	6.68			
	24/V	7.84			
	25/V		8.10– 9.10	1.12	← Cholatlösung
			10.10	0.97	
			1.10	1.38	
			3.10	1.44	
			5.10	1.13	
	26/V				Tetanie
2	27/V				Operation
	28/V	7.94			
	29/V				
	9.26	6.57	8.20– 9.20	3.59	← Cholatlösung
	10.26	6.86	11.20	4.35	
	11.26	6.76	1.20	3.63	
	12.26	6.66	3.20	2.64	
	1.26	6.76			
	30/V				Tetanie

TABELLE III. (Fortsetzung)

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
3	5/V				Operation
	8/V				
	9.05	7.55	8.00- 9.00	1.24	← Cholatlösung
	10.05	8.23	11.00	1.59	
	11.05	8.33	1.00	1.68	
	12.05	7.64	3.00	1.06	
	1.05	7.64	5.00	1.64	
	2.05	7.44			
	11/V				Tetanie
4	5/V				Operation
	10/V				
	9.00	7.06	9.05-10.05	2.77	← Cholatlösung
	10.00	6.85	12.05	5.53	
	11.00	7.38	2.05	7.79	
	12.00	7.49	4.05	3.83	
	1.00	7.49	6.05	3.75	
5	25/V				Operation
	28/V				
	9.10	6.74	8.05- 9.05	1.17	← Cholatlösung
	10.10	6.79	11.05	4.48	
	11.10	6.38	1.05	3.93	
	12.10	7.06	3.05	2.73	
	1.10	6.65	5.05	1.24	
	2.10	6.59			Tetanie
6	29/V				Operation
	1/VI	7.94			
	2/VI	6.27			
	3/VI				
	9.05	5.59	8.00- 9.00	0.68	← Cholatlösung
	10.05	6.39	11.00	0.91	
	11.05	7.57	1.00	1.00	
	12.05	7.06	3.00	1.18	
	1.05	5.49	5.00	1.02	
	2.05	5.29			

Aus der Tabelle III lässt sich ersehen, dass der Kalkgehalt im Blut der thyreoparathyreopriven Hündinnen ebenfalls durch Zufuhr von Cholsäure gesteigert wird, und dass diese Steigerung schon nach der ersten Stunde nach der Zufuhr auftritt und nach 2 Stunden ihr Maximum erreicht.

Diese hypercalcämische Wirkung der Cholsäure tritt viel schwächer auf als bei normaler Hündin. Auch wenn dieselbe Menge von Cholsäure der thyreoparathyreopriven Hündin einmal nach der Operation parenteral verabreicht wurde, konnte dadurch der tetanische Anfall nicht verhütet werden. Was die Kalkausscheidung im Harn betrifft, so wird sie, ausgenommen bei Nr. 2, durch Zufuhr von Cholsäure in allen Fällen vermehrt, und diese Vermehrung tritt, wie im Blut, viel schwächer und verzögerter auf als bei normaler Hündin. Aus den Resultaten scheint mir, dass die hypercalcämische Wirkung der Cholsäure unabhängig von der Funktion der Nebenschilddrüse vor sich geht.

4. Versuch bei Zufuhr von Thyroxin bei thyreoparathyreopriven Hündin.

Hierbei wurde der thyreoparathyreopriven Hündin 0.5–1.5 mg Thyroxin (Thyroxine B.D.H.) pro kg Körpergewicht intravenös verabreicht, und vor und nach der Zufuhr wurde der Kalkgehalt im Blut und Harn bestimmt. Die Tabelle IV zeigt, dass der Calciumspiegel des Blutes bei Zufuhr von Thyroxin im Vergleich mit dem Versuch bei einfacher Blutentnahme keinen Unterschied zeigt. Die Hypercalcämie bei Hündin Nr. 1 und 2, verglichen mit der Kontrolle, ist so gering, dass sie in der Fehlergrenze des Versuches liegt. Die Calciumausscheidung im Harn wird dagegen durch Zufuhr von Thyroxin etwas gesteigert. Bei den Fällen von Hündin Nr. 2 und 3 wurde die anfangs vermehrte und dann wieder verringerte Kalkausscheidung nach 6–8 Stunden wieder vermehrt. Diese Kalkausscheidung im Harn infolge von Thyroxin geht also ganz anders vor sich als die durch Gallensäure bewirkte.

TABELLE IV.

Bei Zufuhr von Thyroxin bei thyreoparathyreopriver Hündin.

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
1	14/VII				Operation
	15/VII	10.34			
	16/VII				
	9.00	7.52	7.55- 8.55	1.40	← Thyroxin
	10.00	7.24	10.55	1.51	
	12.00	6.11	12.55	1.66	
	2.00	6.67	2.55	1.27	
	4.00	6.86	4.55	1.15	
2	8/VII				Operation
	9/VII	10.06			
	10/VII				
	9.05	9.59	8.00- 9.00	1.56	← Thyroxin
	11.05	8.84	11.00	1.75	
	1.05	8.84	1.00	1.54	
	3.05	8.55	3.00	1.27	
			5.00	1.47	
3	19/VII				Operation
	21/VII				
	9.05	7.01	8.00- 9.00	1.56	← Thyroxin
	10.05	6.84	11.00	1.75	
	12.05	6.77	1.00	1.54	
	2.05	6.44	3.00	1.56	
	4.05	—	5.00	1.80	
	6.05	6.44	7.00	1.93	
4	28/VII				Operation
	30/VII				
	8.50	7.95	7.45- 8.45	1.03	← Thyroxin
	10.50	7.21	10.45	1.46	
	12.50	—	12.45	1.07	
	2.50	7.02	2.45	1.10	
	4.50	6.88	4.45	1.11	

TABELLE IV. (Fortsetzung)

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
5	14/VII				Operation
	16/VII				
	9.05	9.59	8.00– 9.00	4.12	← Thyroxin
	11.05	8.93	11.00	4.42	
	1.05	8.84	1.00	3.76	
	3.05	8.84	3.00	2.29	
	5.05	8.46	5.00	2.11	
6	22/VII				Operation
	24/VII				
			7.40– 8.40	1.22	← Thyroxin
			10.40	1.79	
			12.40	1.80	
			2.40	1.63	
			4.40	1.83	
			6.40	1.49	
			8.40	1.53	

5. Versuch bei Zufuhr von Thyroxin und Cholsäure bei
thyreoparathyreopriven Hündin.

Bei diesem Versuch wurde der thyreoparathyreopriven Hündin dieselbe Menge von Thyroxin und Cholsäure genau wie bei Versuch 3 und 4, aber hintereinander verabreicht. Der Kalkgehalt im Blut und Harn wurde vor und nach der Zufuhr bestimmt.

Aus der Tabelle V erhellt, dass der Kalkgehalt des Blutes der thyreoparathyreopriven Hündin durch Zufuhr von Thyroxin und Cholsäure ganz leicht gesteigert wird. Diese Vermehrung tritt viel schwächer auf als die bei Zufuhr von Cholsäure allein. Der Kalkgehalt des Harns der thyreoparathyreopriven Hündin wird durch Zufuhr von Cholsäure und Thyroxin vermehrt, was hauptsächlich durch die Wirkung der Cholsäure bedingt zu sein scheint. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Wirkungen der Cholsäure und des Thyroxins auf den Calciumstoffwechsel bei der thyreoparathyreopriven Hündin unabhängig voneinander vor sich gehen.

TABELLE V.

Bei Zufuhr von Thyroxin und Cholsäure bei thyreopara-
thyreopräver Hündin.

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
1	13/VIII				Operation
	15/VIII				
	9.00	7.44	7.55- 8.55	1.82	Thyroxin u. ← Cholatlösung
	11.00	6.60	10.55	2.12	
	1.00	6.60	12.55	2.20	
	3.00	6.70	2.55	2.01	
	5.00	6.60	4.55	1.89	
	7.00	6.51	6.55	1.72	
2	11/VIII				Operation
	13/VIII				
	9.05	6.14	8.00- 9.00	1.15	Thyroxin u. ← Cholatlösung
	11.05	6.32	11.00	1.32	
	1.05	6.70	1.00	1.11	
	3.05	6.95	3.00	1.14	
	5.05	5.67	5.00	1.06	
	7.05	5.86	7.00	1.32	
3	20/VIII				Operation
	22/VIII				
	9.15	6.32	8.10- 9.10	1.11	Thyroxin u. ← Cholatlösung
	10.15	6.14	11.10	1.87	
	12.15	5.91	1.10	2.46	
	2.15	5.91	3.10	1.51	
	4.15	5.86	5.10	1.21	
	6.15	5.58	7.10	1.57	
4	24/VIII				Operation
	26/VIII				
	8.50	7.81	7.45- 8.45	1.97	Thyroxin u. ← Cholatlösung
	9.50	7.31	11.45	2.74	
	11.50	7.35	12.45	4.21	
	1.50	7.11	2.45	2.02	
	3.50	7.05	4.45	1.66	
	5.50	6.78	6.45	2.60	

6. *Versuch bei Zufuhr von Parathyreidaextrakt bei thyreoparathyreopriven Hündin.*

Bei diesem Versuch wurde der thyreoparathyreopriven Hündin Parathyreidaextrakt (Parathyrenin) 4–5 cem subkutan injiziert, und vor und nach der Zufuhr der Kalkgehalt im Blut und im Harn bestimmt. Die Resultate sind in der folgenden Tabelle VI zusammengestellt.

Aus der Tabelle VI ist zu ersehen, dass der Kalkgehalt des Blutes der thyreoparathyreopriven Hündin durch die Zufuhr von Parathyreidaextrakt vermehrt wird. Diese Vermehrung tritt, verglichen mit den von anderen Autoren beobachteten Resultaten, viel schwächer auf. Die nach der Operation allmählich herabgesetzte Kalkausscheidung im Harn wird durch Zufuhr von Parathyreidaextrakt wieder erhöht, was in Tabelle VI zu sehen ist.

7. *Versuch bei Zufuhr von Parathyreidaextrakt und Cholsäure bei thyreoparathyreopriven Hündin.*

Hierbei wurde der thyreoparathyreidektomierten Hündin dieselbe Menge von Parathyreidaextrakt und Cholsäure wie bei den Versuchen 3 und 6 hintereinander verabreicht, und zwar wurde die erstere subkutan, die letztere intravenös eingeführt. Der Kalkgehalt des Blutes und im Harn wird, ob die Zufuhr von Parathyreidaextrakt mit oder ohne Cholsäure erfolgt, nicht merklich verändert (vergleiche Tabelle III, VI und VII). Wenn auch der Kalkgehalt im Blut und die Kalkausscheidung im Harn natürlich dadurch vermehrt wird, so erfolgt doch die Vermehrung des Kalkes im Blut und im Harn durch Parathormon und Cholsäure nicht synergistisch. Aus den oben angeführten Ergebnissen scheint mir hervorzugehen, dass die hypercalcämische Wirkung der Cholsäure unabhängig von der Wirkung der Hormone aus Schilddrüse und Nebenschilddrüse vor sich geht, und dass die Cholsäure bei diesem Versuch die parathyreidektomierte Hündin vor dem tetanischen Anfall nicht schützen kann.

TABELLE VI.
Bei Zufuhr von Parathyreoidaeextrakt bei thyreoparathyreo-
priver Hündin.

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
1	18/I				Operation
	20/I				Parathyreoi- daextrakt
	7.45	8.51	7.40		
	9.45	8.57	9.40	1.12	
	11.45	8.00	11.40	0.95	
	1.45	7.91	1.40	0.94	
	3.45	7.54	3.40	1.08	
	5.45	7.45	5.40	1.05	
	8.45	6.80	7.40	0.89	
			9.40	0.78	
2	18/I				Operation
	20/I				Parathyreoi- daextrakt
	7.40	7.20	7.35	1.52	
	9.40	7.74	9.35	1.31	
	11.40	7.85	11.35	1.43	
	1.40	7.35	1.35	1.42	
	3.40	7.62	3.35	0.99	
	5.40	7.66	5.35	0.82	
	8.40	7.55	7.35	0.88	
			9.35	0.73	
3	15/XII				Operation
	17/XII				Parathyreoi- daextrakt
	8.00	8.14	8.20		
	10.10	8.28	10.20	0.83	
	12.10	8.28	12.20	1.19	
	2.10	8.65	2.20	1.07	
	5.10	8.37	4.20	1.01	
	8.10	8.46	6.20	0.95	
			8.20	1.11	
			10.20	1.01	
4	14/I				Operation
	16/I				Parathyreoi- daextrakt
	7.55	6.03	7.50		
	9.55	6.49	9.50	1.40	
	11.55	6.26	11.50	1.68	
	1.55	6.54	1.50	1.98	
	3.55	6.35	3.50	2.10	
	5.55	6.21	5.50	1.66	
	7.55	5.93	7.50	1.67	

TABELLE VII.

Bei Zufuhr von Parathyreoidaeextrakt mit Cholsäure bei
thyreoparathyreopraver Hündin.

Hündin Nr.	Datum	Serum-Ca mg %	Datum	Harn-Ca mg	Bemerkung
1	15/XII				Operation
	17/XII				
	7.40	6.07	7.30		← Parathyreoi- daextrakt u. Cholatlösung
	8.45	5.89	9.30	1.29	
	10.45	5.98	11.30	1.47	
	1.45	5.89	1.30	1.76	
	4.45	6.35	3.30	1.95	
	7.45	6.72	5.30	1.73	
	10.45	6.25	7.30	1.45	
2	21/XII				Operation
	23/XII				
	8.15	7.04	8.08		← Parathyreoi- daextrakt u. Cholatlösung
	10.15	7.08	10.08	0.95	
	12.15	7.08	12.08	0.92	
	2.15	7.08	2.08	0.81	
	4.15	6.99	4.08	0.76	
	6.15	7.41	6.08	0.71	
	8.15	7.45	8.08	0.73	
3	26/I				Operation
	28/I				
	7.40	8.74	7.35		← Parathyreoi- daextrakt u. Cholatlösung
	9.40	8.33	9.35	1.05	
	11.40	8.65	11.35	0.92	
	1.40	8.37	1.35	0.74	
	3.40	8.37	3.35	1.01	
	5.40	8.19	5.35	0.80	
	7.40	8.19	7.35	0.80	
	9.40	—	9.35	0.70	
4	23/I				Operation
	25/I				
	7.40	6.70	7.35		← Parathyreoi- daextrakt u. Cholatlösung
	9.40	6.66	9.35	1.12	
	11.40	6.71	11.35	1.00	
	1.40	7.11	1.35	1.00	
	3.40	7.00	3.35	1.21	
	5.40	6.62	5.35	0.92	
	8.40	6.48	7.35	0.95	
			9.35	0.83	

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Die wiederholte Blutentnahme ruft eine leichte Hypocalcämie hervor, welche bald nach der Unterbrechung der Blutentnahme zum normalen Wert zurückkehrt. Die Calciumausscheidung im Harn vermindert sich dadurch mit der Zeit etwas.

2. Die Zufuhr von Cholsäure führt zu einer Steigerung des Kalkgehaltes im Blut und im Harn bei normalen wie thyreoparathyreopriven Hündinnen.

3. Der Kalkgehalt des Blutes und des Harns von thyreoparathyreidektomierten Hündinnen bleibt durch Zufuhr von Thyroxin entweder fast unbeeinflusst oder wird etwas erhöht.

4. Die gleichzeitige Zufuhr von Thyroxin mit Cholsäure ruft eine leichte Hypercalcämie hervor und eine erhöhte Kalkausscheidung im Harn von thyreoparathyreidektomierten Hündinnen. Diese leicht hypercalcämische und die Kalkausscheidung im Harn vermehrende Wirkung bei der Mitzufuhr der beiden Hormone tritt nicht stärker auf als die bei Zufuhr von Cholsäure allein. Die Wirkung des Thyroxins und die der Cholsäure auf den Calciumstoffwechsel von thyreoparathyreidektomierten Hündinnen geht also unabhängig voneinander vor sich.

5. Die Zufuhr von Parathyreoideaextrakt führt eine Hypercalcämie und gesteigerte Kalkausscheidung im Harn von thyreoparathyreidektomierten Hündinnen herbei.

6. Die gleichzeitige Zufuhr von Parathyreoideaextrakt und Cholsäure veranlasst eine Hypercalcämie und gesteigerte Kalkausscheidung im Harn von thyreoparathyreidektomierten Hündinnen. Diese hypercalcämische und die Kalkausscheidung im Harn vermehrende Wirkung bei der gleichzeitigen Zufuhr der beiden Substanzen tritt nicht stärker auf als die bei der Zufuhr der einen allein. Die beiden hormonalen Wirkungen auf den Calciumstoffwechsel von thyreoparathyreidektomierten Hündinnen treten also unabhängig von einander auf.

LITERATUR.

- Bischoff, G. (1930): Z. physiolog. Chem., **188**, 247.
 Collip, J. B. (1925): J. biolog. chem., **63**, 395.
 Cori, K. (1921): Arch. exp. Path. u. Pharm. **91**, 130.
 Davidson, C. E. und Emerson, W. C. (1927): Arch. Surg., **15**, 57
 Demole, V. und Christ, A. (1929): Arch. exp. Path. u. Pharm., **146**, 361.
 Ellinger, P. (1921): Arch. exp. Path. u. Pharm., **90**, 77.
 Eppinger, H. (1908): Z. kl. Med., **66**, 32.
 Fuziwara, K. (1931): J. Bioch., **13**, 465.
 Greenwald, I. and Gross, J. (1925): J. biolog. chem., **66**, 217.
 Greenwald, I. and Gross, J. (1928): J. biolog. chem., **78**, 68.
 Hess, A. F., Weinstock, M. and Rivikin, H. (1930): Proc. Soc. Exp. Biolog. u. Med., **27**, 298.
 Hess, A. F., Benjamin, H. R. and Gross, J. (1931): J. biolog. chem., **94**, 1.
 Higashi, S. (1930): Arb. Med. Univ. Okayama, **1**, 582.
 Holtz, F. und Schreiber, E. (1930): Z. physiolog. Chem., **191**, 1.
 Inouye, T. (1922): Tokyo Igakkai Zasshi, **36**, 99.
 Jones, J. H. (1926): J. biolog. chem., **70**, 647.
 Jones, J. H., Rapoport, M. and Hodes, H. L. (1930): J. biolog. chem., **86**, 267.
 Kawada, Y. (1931): J. Biochem., **13**, 133.
 King, T. H. and Stewart, H. A. (1909): J. exp. Med., **11**, 673.
 Kitayama, K. (1927): Okayama Igakkai Zasshi, Nr. **444**, 1.
 Kraus, Fr. und Friedenthal, H. (1908): Berl. kl. Ws., **2**, 1709.
 Okamura, T. (1928): J. Bioch., **9**, 271 u. 445.
 Okii, I. (1932): J. Bioch., **16**, 217.
 Robison, R. and Soames, K. M. (1924): Bioch. J. **18**, 740.
 Rominger, E., Meyer, H. und Bomskov, C. (1930): Kl. Ws., **2**, 1391.
 Rominger, E., Meyer, H. und Bomskov, C. (1930): Z. exp. Med., **73**, 343.
 Schittenhelm, A. und Eisler, B. (1928): Z. exp. Med., **61**, 239.
 Sekitoo, T. (1930): J. Bioch., **12**, 59.
 Sekitoo, T. (1930): J. Bioch., **11**, 251 u. 391.
 Taku, A. (1928): J. Bioch. **9**, 299.
 Tsuji, K. (1930): J. Bioch., **12**, 139.
 Waltner, K. (1928): Monatsschr. Kinderheilk., **40**, 317.
 Wollheimer, E. (1929): Bioch. Z., **151**, 416.
 Zondek, S. G. (1922): Bioch. Z., **132**, 362.
 Zondek, S. G. (1929): Arch. exp. Path. u. Pharm., **143**, 192.

ÜBER DEN EINFLUSS VERSCHIEDENER ORGANISCHER VERBINDUNGEN AUF DIE UREASE.

VON

TADASHI TAKEUCHI.

(Aus dem Medizinisch-Chemischen Institut der Medizinischen Akademie zu Chiba. Direktor: Prof. S. Akamatsu.)

(Eingegangen am 21. September 1932)

Über den Einfluss der organischen Substanzen auf die Urease-wirkung sind schon viele Angaben vorhanden. Falk (1914) hat zuerst eine begünstigende Wirkung des Serums gefunden, die von Jacoby und Umeda (1915) auch an Aminosäuren, z. B. Glycin, Alanin, Tyrosin, Glutaminsäure und Leucin, bestätigt wurde. Bei diesen Experimenten wurde aber die Azidität des Mediums nicht berücksichtigt. Rona und György (1920) untersuchten die aktivierende Wirkung der Aminosäuren und fanden, dass diese Wirkung in Gegenwart von Phosphatpuffer ausblieb. Nach diesen Autoren sollte die günstige Wirkung der Aminosäuren, die bis dahin von einigen Forschern angegeben wurde, darauf zurückzuführen sein, dass die Azidität der Lösung durch Zusatz von amphoteren Substanzen dem Optimum genähert und gleichzeitig gepuffert worden ist. Rockwood und Husa (1923, 24, 26) haben dann bei gepuffertem Medium den Einfluss recht verschiedener Substanzen auf die Urease-wirkung untersucht. Im allgemeinen fanden sie eine beschleunigende Wirkung, die teils auf die gemässigte Abschwächung der Urease-aktivität zurückzuführen ist, aber hauptsächlich von der spezifisch aktivierenden Wirkung der betreffenden Substanzen selbst verursacht wurde. Jacoby (1927) fand später im Histidin eine enorm starke Aktivierung auf, die weit über die allgemeine Aminosäurenwirkung hinausgeht. Das Arginin und das Lysin konnten aber keineswegs an die Wirksamkeit des Histidins heranreichen.

Die Urease ist bekanntlich ein labiles Ferment. Wenn eine begünstigende Wirkung überhaupt in den zugesetzten organischen

Substanzen nachzuweisen ist, müsste der Aktivierungsmechanismus experimentell analytisch untersucht werden. Dabei sind zwei Faktoren in Erwägung zu ziehen:

Erstens die Stabilisierung des Ferments durch die Anwesenheit der betreffenden Substanzen, und zweitens die spezifische Beeinflussung der Reaktionsgeschwindigkeit der Fermentreaktion. Die Versuche müssen selbstverständlich in einer bestimmten Azidität unter Pufferung ausgeführt werden. Die Schutzwirkung der zugesetzten Substanzen ist leicht zu schätzen, indem die Urease-lösung in der ersten Probe mit, und in der zweiten ohne die zu prüfende Substanz bei einer bestimmten Azidität für eine bestimmte Zeit stehen gelassen, und dann mit Harnstoff (bei der zweiten ausserdem mit der zu prüfenden Substanz) versetzt, und nach einer bestimmten Wirkungsdauer die entstandenen Ammoniakmengen miteinander verglichen werden. Die selektive Bestimmung des Beeinflussungsgrads hinsichtlich der Reaktionsgeschwindigkeit wird dagegen nur dadurch ermöglicht, dass ein kräftiges Fermentpräparat gebraucht, und dementsprechend die Versuchsdauer verkürzt wird, um den die Stabilität bedingenden Faktor auszuschliessen.

Unter diesen Erwägungen wurde das vorliegende Experiment unternommen. Die wirksame Urease wurde aus Jackbohnen hergestellt. Die Versuche wurden alle bei $\text{pH } 6.8$ in Gegenwart von Phosphatpuffer ausgeführt. Versuchsdauer 10 Minuten. Die Kontrolle zeigte $35 \pm 0.5\%$ ige Hydrolyse des vorhanden gewesenen Harnstoffes.

Die zuzusetzende Lösung der organischen Substanzen wurde vorher genau gegen Lakmus neutralisiert. Bei $\text{pH } 6.8$ besitzen die untersuchten Verbindungen fast kein Pufferungsvermögen, und daher veränderte der Zusatz der neutralisierten Lösung der betreffenden Substanzen keineswegs die durch den Phosphatpuffer hergestellte Azidität des Versuchsansatzes.

Zuerst wurde die Monoaminomonocarbonsäure geprüft. Glykokoll beschleunigte beträchtlich die Urease-wirkung. Auch das Alanin nahm an diesem aktivierten Vermögen teil, obwohl in geringerem Masse als das Glykokoll. Die den Aminosäuren

allgemein zugeschriebene Ureasenaktivierung konnte damit wenigstens bei dieser Art Aminosäure bestätigt werden. Aber bei den Monoaminodicarbonsäuren war eine solche Aktivierung keineswegs zu beobachten. Die Asparaginsäure und die Glutaminsäure blieben ohne Einfluss auf die Reaktionsgeschwindigkeit. Das Amid der Monoaminodicarbonsäure, z.B. das Asparagin, verhielt sich in gleicher Weise.

Bei den Diaminosäuren, Arginin und Histidin, wurde sogar eine Hemmung beobachtet, und die Herabsetzung der Reaktionsgeschwindigkeit war besonders auffallend bei der letzteren. Wie früher erwähnt, haben Jacoby und Umeda in dieser Aminosäure eine enorm starke Aktivierung beobachtet. Da diese aber das Resultat eines 20stündigen Versuchs war, sollte man dem Histidin ausschliesslich eine unübertreffliche Schutzwirkung gegen Fermentzerfall zuerkennen. Dann wurden Versuche mit Harnstoffderivaten angestellt. Methylharnstoff hemmte die Ureasenwirkung in leichtem Grade. Die Säureureide, wie Acetylharnstoff, Chloracetylharnstoff, Glycylharnstoff und Bernsteinsäuremonoureid, übten aber eine stärkere Hemmung aus. Hinsichtlich des Hemmungsgrads sind bei jenen Säureureiden die Arten der Acylreste fast belanglos. Man sieht ausserdem, dass das Decken der freien Carboxylgruppe des Glykokolls diese Aminosäure zur spezifischen Aktivierung unfähig machte, und sogar aufs neue eine hemmende Wirkung veranlasste, was durch den eingeführten Harnstoffrest verursacht sein sollte.

Die Hydantoinssäure blieb aber fast wirkungslos. Daher ging der Austausch der Aminogruppe des Glykokolls mit dem Harnstoffrest nur insofern vonstatten, dass die spezifische Aktivierung dieser Aminosäure aufgehoben wurde. Das Asparagin zeigte andererseits, wie erwähnt, keinen Einfluss auf die Ureasenwirkung. Die entsprechende Uraminosäure blieb auch wirkungslos. Die Umwandlung der Aminogruppe des Asparagins in die Uraminogruppe—Ureidobernsteinsäureamid—rief darum kein neues Verhalten hervor. Das Verhältnis war aber ein ganz anderes bei Monoaminodicarbonsäuren. Die ohne Wirkung gebliebene Glutaminsäure übte nun nach entsprechender Überführung in die

Ureidoglutarsäure eine auffallende Hemmung auf die Ureasenwirkung aus. Angesichts der fehlenden Beeinflussung des Ureidobernsteinsäureamids und der Asparaginsäure kann man wohl den hemmenden Faktor in der Gegenwart der beiden freien Carboxylgruppen und der bedeckten Aminogruppe suchen.

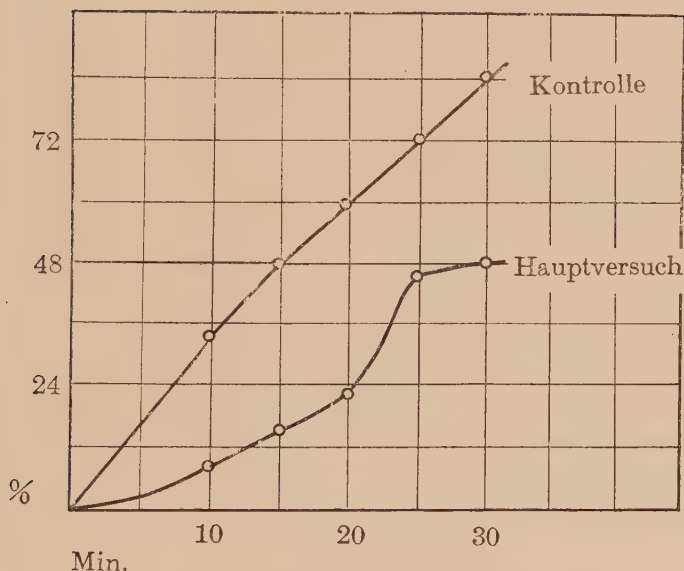
Darum war es interessant zu untersuchen, wie die Glycyl-derivate der Asparaginsäure und ihres Amids die Ureasenwirkung beeinflussen würden. Der Versuch zeigte keinen Einfluss des Glycylasparagins und eine unerwartet hohe Hemmung der Glycylasparaginsäure. Hierbei dürfte eine leicht hemmende Wirkung des Glycylglycins angegeben werden. Die spezifische Aktivierung des Glycins wurde also wieder durch seine Bindung mit einem anderen Molekül Glycin aufgehoben. Wenn man die obenerwähnten Uraminosäuren und Glycylpeptide nach der chemischen Verwandtschaft so einordnet, wie erstens Hydantoinssäure und Glycylglycin, zweitens Ureidoglutarsäure und Glycylasparaginsäure und drittens Ureidobernsteinsäureamid und Glycylasparagin, so ist der Zusammenhang der chemischen Konstitution mit dem Hemmungsgrad der betreffenden Verbindungen klar zu erkennen. Besonders auffallend war die starke Hemmung der Glycylasparaginsäure. Bei Anwesenheit dieses Dipeptids blieb die Hydrolyse des Harnstoffes nach 10 Minuten bei nur 7–8%, während der gleichzeitig angestellte Kontrollversuch 35%ige Aufspaltung ergab. Der Hemmungsgrad ging weit über die Erwartung hinaus.

Im vorliegenden Experiment betrug die Versuchsdauer, wie erwähnt, im allgemeinen 10 Minuten, und die Konzentration der auf ihre Beeinflussung zu prüfenden Substanzen $M/12$ in den Versuchslösungen.

Um die abnorme Hemmung der Glycylasparaginsäure aufzuklären, wurden die folgenden Versuche ausgeführt:

Erstens wurde die Versuchsdauer auf 15, 20, 25 und 30 Minuten verlängert. Dabei konnte man beobachten, dass das jeweils in 5 Minuten freigemachte Ammoniak immer mehr anwuchs, falls die Ureasenwirkung weiter fortgesetzt wurde, und dass sich daher die Zeit-Aktivitätskurve allmählich der Kontrollenkurve näherte, ohne sie jedoch zu erreichen.

Fig. 1.

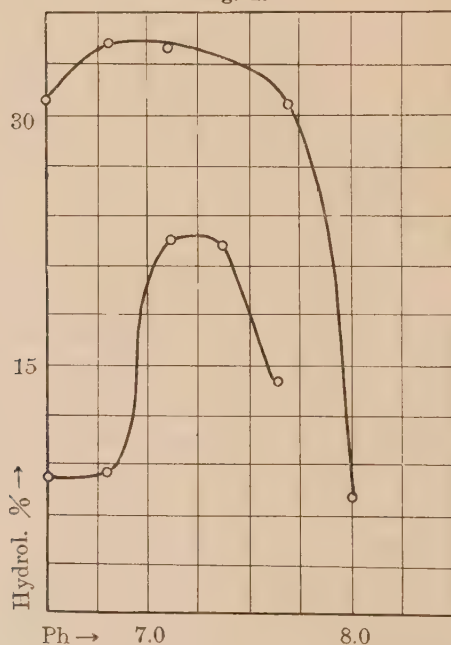


Nun wurde die Konzentration der zuzusetzenden Glycyl-asparaginsäure 10fach verdünnt. Unter dieser Bedingung stieg die Hydrolyse des Harnstoffes nach 10 Minuten auf 32%. Durch Verminderung des Dipeptidgehaltes setzte sich also der Hemmungsgrad in beträchtlichem Masse herab. Aus diesen Ergebnissen könnte man zunächst annehmen, dass die vorhandene Glycyl-asparaginsäure durch irgend ein Ferment, das eventuell im Ureasenpräparat beigemischt wäre, mit der Zeit so verändert oder abgebaut werde, dass die entstandenen Produkte nicht mehr anti-ureatisch wirksam seien. Dies war aber nicht der Fall; die Glycyl-asparaginsäure blieb während der Versuchsdauer intakt, was durch die folgenden Versuche bewiesen wurde. Beim Aufbewahren des Dipeptids mit Ureasenpräparat bei pH 6.8 wuchs weder die titrierbare Carboxyl- noch die Aminogruppe an. Die hydrolytische Spaltung des betreffenden Dipeptids in Glycin und Asparaginsäure war also auszuschliessen. In einem anderen Experiment wurde die spezifische Drehung des Dipeptids vor und nach Aufbewahren mit Ureasenpräparat oder mit Harnstoff-Urease-Gemisch bei pH 6.8

gemessen. Sie blieb unverändert. Razemisierung oder irgend eine andere Veränderung, wie Überführung in Glycylasparagin, wurde also ausgeschlossen.

Da die erste Annahme für die Erklärung der starken Hemmung der Glycylasparaginsäure experimentell hinfällig war, wurde eine zweite aufgestellt: dass das P_H -Optimum der Ureasenwirkung in Gegenwart des betreffenden Dipeptids verschoben würde. Es wurden daher Versuche mit dem Dipeptidzusatz bei verschiedener Azidität ausgeführt. Während die parallel angestellten Kontrollversuche die maximale Hydrolyse nach 10 Minuten bei P_H 6.8–7.1 zeigten, und eine ziemlich starke Aufspaltung auch noch bei P_H 6.5 und 7.7 bemerkbar war, ergab sich beim Versuch in Gegenwart von Dipeptid P_H 7.1 als die optimale Azidität, obwohl der Betrag des Harnstoffzerfalls in diesem Optimum in Vergleich zum Kontrollversuch weit geringer war.

Fig. 2.



Die Glycylasparaginsäure wirkt also überhaupt stark hemmend

auf die Ureasenwirkung. Es soll aber besonders betont werden, dass die Harnstoffspaltung in Gegenwart jenes Dipeptids gegen die Azidität des Mediums sehr eigentümlich empfindlich war. Die Ammoniakbildung ging beim Übergang der Azidität von P_H 7.1 zu P_H 6.8 plötzlich um fast $2/3$ herunter. Der daran anschliessend angestellte Versuch ergab, dass die Azidität der Versuchslösung bei Dipeptidzusatz bis zu 10 Minuten ihren anfänglichen P_H 6.8 beibehielt, aber nach 20 Minuten schon das Optimum, P_H 7.1, überschritt und nach 30 Minuten bis zu P_H 7.5 verschoben wurde, wo doch noch eine verhältnismässig starke Hydrolyse zu beobachten war. Der Kontrollversuch ohne Glycylasparaginsäure zeigte keine Veränderung der anfänglich gepufferten Azidität während der halbstündigen Beobachtung.

Die abnorme Hemmungswirkung der Glycylasparaginsäure konnte damit aufgeklärt werden. Jedenfalls ist es bemerkenswert, dass die Glycylasparaginsäure in eigentümlicher Weise anti-ureatisch wirkt, obwohl ihre Bestandteile, Glycin und Asparaginsäure, auf die Urease unwirksam oder sogar stark aktivierend sind, und dass ausserdem die Überführung jenes Dipeptids in Säureamid Schwund des eigentlichen Hemmungsvermögens veranlasst.

Ausserdem ist mitzuteilen, dass Oxyharnstoff die Ureasenwirkung sehr stark hemmte. Diese Verbindung ist strukturell dem Harnstoff verwandt, aber ihre stark hemmende Wirkung verdankt sie ihrer reduzierenden Natur. Hydroxylamin und Hydrochinon, die beide selbstverständlich den reduzierenden Verbindungen angehören, hemmten die Wirkung der Urease in gleicher Weise, wie Oxyharnstoff.

EXPERIMENTELLER TEIL.

Das Ureasenpräparat wurde nach Van Slyke und Cullen (1914) aus Jackbohnen hergestellt und war im Wasser leicht löslich. Eine 1%ige Lösung wurde bei jedem Versuch frisch hergestellt.

Die Konzentration der Harnstofflösung war $M/10$ in $M/10$ Phosphatpuffer von P_H 6.8. Diese Lösung war haltbar. 1 M Lösung der organischen Substanzen, deren Einfluss auf Urease

zu untersuchen war, wurde so bereitet, dass eine abgewogene Menge in Wasser gelöst, mit Natronlauge gegen Lakmus neutralisiert und mit Wasser auf ein bestimmtes Volumen verdünnt wurde. Die Versuche wurden wie folgt ausgeführt: 10 cem Harnstoff-Phosphatlösung und 1 cem der zu prüfenden neutralisierten Substanz wurden in einem Folinschen Reagenzglas gemischt und bei 37°C in ein elektrisch reguliertes Wasserbad eingetaucht. Beim Kontrollversuch wurden 10 cem Harnstoff-Phosphatlösung und 1 cem Wasser in gleicher Weise vorerwärmt. Die Ureasenlösung wurde 10 Minuten in demselben Wasserbad erwärmt, 1 cem davon schnell abpipettiert und in die Versuchslösung eingeströmt. Genau nach 10 Minuten wurde die Fermentwirkung durch Zusatz von 0.5 cem HCl ($D=1.19$) unterbrochen.

Die Bestimmung des Ammoniaks geschah nach Folin. Ein Kontrollversuch wurde zu jedem Experiment parallel ausgeführt und lieferte $35 \pm 0.5\%$ ige Hydrolyse des vorhandenen Harnstoffes.

A. *Monoaminomonocarbonsäure.*

Es wurden Glykokoll und Alanin von Kahlbaum gebraucht.

TABELLE I.

Glykokoll		Alanin	
NH ₃ in mg	hydrolyt. %	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
14.63	43.2	12.36	37.0

B. *Monoaminodicarbonsäure.*

Asparaginsäure von Merck. Die Glutaminsäure wurde im hiesigen Institut hergestellt.

TABELLE II.

Asparaginsäure		Glutaminsäure	
NH ₃ in mg	hydrolyt. %	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
11.95	35.3	11.76	35.0

C. Monoaminodicarbonsäureamid.

Asparagin von Merck.

TABELLE III.

Asparagin	
NH ₃ in mg	hydrolyt. %
11.90	35.2

D. Diaminosäure.

Arginincarbonat und Nitrat wurden im hiesigen Institut aus Gelatinhydrolysat isoliert. Histidinmonochlorhydrat von Takeda.

TABELLE IV.

Substanzen	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
Argininnitrat	10.18	30.1
Arginincarbonat	9.37	28.0
Histidin-HCl	8.82	26.1

E. Harnstoffderivate.

Methylharnstoff von Kahlbaum. Oxyharnstoff wurde nach Hantzsch (1898) aus Kaliumcyanat und Hydroxylaminchlorhydrat hergestellt. Schmelzpunkt 139–140°C.

TABELLE V.

Substanzen	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
Methylharnstoff	11.24	33.2
Oxyharnstoff	2.36	7.0

TABELLE VI.

Substanzen	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
Hydroxylamin-HCl	2.49	7.3
Hydrochinon	2.46	7.2

F. Säureureide.

Acetylharnstoff konnte man nach Moldenhauer (1855) durch Acetylieren des Harnstoffes herstellen. Die aus heissem Wasser umkristallisierte Substanz schmolz bei 212°C.

Chloracetylharnstoff wurde nach Tommasi (1873) aus Chloracetylchlorid und Harnstoff dargestellt und aus 40%igem heissem Alkohol umkristallisiert. Schmelzpunkt 160°C. Man aminierte diese Substanz, indem man sie mit dem 5fachen Volumen gesättigten ammoniakalischen Alkohols in Druckflasche auf 100°C 1 Stunde erhitzte. Der ausgeschiedene Glycylharnstoff wurde mit Alkohol gewaschen und aus heissem Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 165°C. *N*-Bestimmung nach Kjeldahl, gefunden 35.7% *N*, berechnet 35.9%.

Bernsteinsäuremonou Reid konnte nach Pike (1873) aus Bernsteinsäureanhydrid und Harnstoff dargestellt und aus Wasser umkristallisiert werden. Schmelzpunkt 203–205°C.

TABELLE VII.

Substanzen	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
Acetylharnstoff	10.63	31.4
Chloracetylharnstoff	10.30	31.0
Glycylharnstoff	10.29	30.4
Bernsteinsäuremonou Reid	10.52	31.1

G. Ureidosäuren.

Hydantoin säure wurde nach Heintz (1865) aus Glykokoll und Harnstoff dargestellt und aus heissem Wasser umkristallisiert. Schmelzpunkt 153–156°C. Ureidobernsteinsäureamid wurde nach Dakin (1910) aus Asparagin und Kaliumcyanat dargestellt. Das aus Wasser umkristallisierte Präparat schmolz bei 151–154°C. *N*-Gehalt; gefunden 23.7%, berechnet 23.8%. Ureidoglutarsäure konnte in derselben Weise aus Glutaminsäure dargestellt werden. Schmelzpunkt 157–160°C.

N-Gehalt: gefunden 14.5%, berechnet 14.6%.

TABELLE VIII.

Substanzen	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
Hydantoinsäure	11.33	34.0
Ureidobornsteinsäureamid	11.87	35.1
Ureidoglutarsäure	8.08	24.0

H. Glycylpeptide.

Glycylglycin wurde über Chloracetylglycin vorher im hiesigen Institut hergestellt.

Glycylasparaginsäure und Glycylasparagin nach Fischer und Friedler (1910) und Fischer und Königs (1904).

TABELLE IX.

Substanzen	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
Glycylglycin	11.32	33.4
Glycylasparaginsäure	2.46	7.2
Glycylasparagin	11.86	35.0

I. Verlängerte Versuche mit Glycylasparaginsäure.

TABELLE X.

Hauptversuch			Kontrollversuch	
Zeit (Min.)	NH ₃ in mg	hydrolyt. %	NH ₃ in mg	hydrolyt. %
10	2.68	7.9	11.85	35.0
15	5.75	17.0	16.30	48.2
20	7.46	22.0	19.46	57.5
25	16.02	47.3	24.59	72.7
30	16.20	47.9	28.53	84.0

J. Einfluss der Azidität auf die Ureasehemmung der Glycylasparaginsäure.

Die Versuchslösung bestand aus:

M/10 Phosphatgemisch

10 ccm

1 M Harnstofflösung

1 „

1 M neutralisiertem Dipeptid oder Wasser 1 ccm
 1% Ureasenlösung 1 „

Die Fermentlösung wurde wie früher vorerwärmt und im Intervall von einer Minute der vorerwärmten Versuchslösung zugesetzt. Die Wirkungsdauer war bei jeder Probe genau 10 Minuten. P_H wurde bei jedem nochmals frisch gemischten Versuchsansatz elektrisch bestimmt.

TABELLE XI.

Hauptversuch			Kontrollversuch		
P_H	NH_3 in mg	hydrolyt. %	P_H	NH_3 in mg	hydrolyt. %
6.5	2.89	8.5	6.5	10.54	31.0
6.8	2.85	8.4	6.8	11.88	35.0
7.1	7.62	22.4	7.1	11.31	33.2
7.3	7.46	21.9	7.7	10.35	30.4
7.6	4.79	14.0	8.0	2.43	7.1

K. Veränderung der Azidität während des Versuchs

Jede Probe bestand aus 10 ccm Harnstoff-Phosphat (P_H 6.8)-Lösung, 1 ccm neutralisierter Glycylasparaginsäure oder Wasser und 1 ccm Ureasenlösung. Je eine Probe diente für die P_H -Bestimmung nach der respektive bestimmten Zeitdauer. P_H wurde mittels Chinhydronelektrode gemessen.

TABELLE XII.

	Hauptversuch	Kontrollversuch
Zeit	P_H	P_H
sofort	6.81	6.80
10 Min.	6.84	6.80
20 „	7.36	6.81
30 „	7.45	6.83

LITERATUR.

- Dakin, H. D. (1910): Amer. Chem. Jour., **44**, 48.
Falk, M. (1914): Biochem. Zeitschr., **59**, 298.
Fischer, E. u. Königs, E. (1904): Berichte Deutsch. Chem. Ges., **37**, 4585.
Fischer, E. u. Friedler, A. (1910): Ann. d. Chem. u. Pharm., **375**, 181.
Hantzsch, A. (1898): Ann. d. Chem., **299**, 99.
Heintz, W. (1865): Ann. d. Chem., **133**, 65.
Jacoby, M. u. Umeda, N. (1915): Biochem. Zeitschr., **68**, 23.
Jacoby, M. (1927): Biochem. Zeitschr., **181**, 194.
Moldenhauer, F. (1855): Ann. d. Chem., **94**, 100.
Pike, W. H. (1873): Berichte Deutsch. Chem. Ges., **6**, 1104.
Rona, P. u. György, P. (1920): Biochem. Zeitschr., **111**, 115.
Rockwood, E. W. u. Husa, W. J. (1923): Jour. biol. Chem., **55**, V.
„ (1924): Jour. Amer. Chem. Soc., **46**, 1641.
„ (1926): „ „ „ **48**, 3199.
Van Slyke, D. D. u. Cullen, G. E. (1914): Jour. biol. Chem., **19**, 211.

ON THE EFFECT OF INSULIN, EPINEPHRINE AND PHLORHIZIN ON THE LACTIC ACID CONTENT AND THE DISTRIBUTION OF PHOSPHATES IN THE BLOOD OF RABBITS.

By

SUSUMU YAMADA.

*(From the Institute of Medical Chemistry, Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. K. Kodama.)*

(Received for publication, September 27, 1932)

Part I.

On the Effect of Insulin, Epinephrine and Phlorhizin on the Lactic Acid Content of Blood of Rabbits.

None of the hypotheses which have so far been published concerning the disappearance of blood sugar of normal animals under the action of insulin, seems entirely free from contradiction.

The idea that the blood sugar is partially converted to glycogen or fat is substantially proved by Dale and his co-workers (1920). This is especially the case when excess of sugar is administered simultaneously with insulin, but not so apparent when such an excess is avoided. In this latter case the increase of sugar combustion seems very plausible. Kellaway and Hughes (1923) have indeed found an increase in the respiratory quotient. They noticed, however, that the oxygen utilised was not sufficient to account for the total amount of glucose which had disappeared. Dudley and Laidlaw and simultaneously Trevan and Boock (1923) have also raised evidence that sugar combustion showed no increase.

In this connection, considerable attention has also been given to the behavior of lactic acid following the injection of insulin. Briggs, Koechig, Doisy and Weber (1924) have published the theory that insulin influences the reaction



in the direction of lactic acid.

Tolstoi and his associates (1923-24) found, however, that the diabetic subjects were not always accompanied by an increase in lactic acid. Collazo and Supniewski (1924) have found that the decrease of blood sugar was rather accompanied by fall of lactic acid in the majority of experiments, in which insulin was administered to fasting animals, though in a few cases a slight increase in lactic acid was observed.

Cori (1925) has found by investigation that insulin hypoglycemia produces no definite change in the lactic acid content of the blood of fasting animals, nor does insulin have any effect on the blood lactic acid of phlorhizinized rabbits or diabetic animals. On the other hand, he has found that insulin convulsions lead to a strong increase in the lactic acid concentration of blood. And these findings have been later confirmed by Matsuoka (1928).

From these experiments we learn that the blood lactic acid content may be influenced by insulin in various ways according to the doses applied and also according to the nutritional condition of the animal.

The author carried out a systematic study upon such effects of insulin. Further those of epinephrine and phlorhizin were studied, in order to get more cogent insight into the behavior of lactic acid in the blood, because both substances have an intimate bearing on carbohydrate metabolism in the animal body.

METHODS.

The estimation of the inorganic phosphorus of blood was carried out by means of Bell-Doisy's (1920) method. For blood sugar Hagedorn-Jensen (1923) technique was applied. Lactic acid was estimated by Clausen's (1922) method, modified by Shaffer, Friedemann and Cotonio (1927).

All of the experiments were carried out on rabbits, which had previously been fasted for about twenty hours, the blood being obtained from the marginal vein of the ear.

*Experiment 1.**The effect of insulin upon the blood lactic acid.*

First of all the author investigated the effect of insulin upon the lactic acid contents in the animals under various nutritional conditions. One group of the animals were nourished by "Okara" and then subjected to fasting during the day before the experiment, and another group was administered 40 cc. of 20 per cent glucose solution, being thus rendered hyperglycemic. The results are given in Tables I and II.

TABLE I.

The effect of insulin on the lactic acid content of the blood of fasting animals.

Date of Exp. s.	Rabbit's Nos., sexes and body weights.	Lactic acid (mg %)		Blood sugar (mg %)		Insulin used units
		Before insulin	After insulin	Before insulin	After insulin	
10/III (1928.)	kg. No. 88, ♂ 2.80.	24.8	15.4	—	—	15
"	No. 89, ♂ 2.10.	16.0	16.4	0.118	0.088	"
"	No. 90, ♀ 2.70.	27.7	23.3	—	—	20
"	No. 91, ♀ 1.70.	35.3	21.4	—	—	"
"	No. 92, ♀ 1.35.	17.6	16.7	—	—	"
	(Average)	24.3	18.6			

TABLE II.

The effect of insulin on blood lactic acid and glucose of the animals, supplied with 40 cc. of 20 p.c. glucose solution, followed by the injection of 40 units of insulin after an interval of about an hour.

Date	Rabbit's Nos., sexes and body weights.	Lactic acid			Blood sugar		
		Before glucose	1 hour after g.	1 hour after insulin	Before glucose	1 hour after g.	1 hour after insulin
13/III (1928.)	kg. No. 101, ♀ 2.75.	19.9	24.7	27.5	0.086	0.314	0.220
"	No. 102, ♂ 1.95.	23.7	20.2	29.7	0.113	0.340	0.207
"	No. 103, ♀ 2.05.	22.2	23.9	36.6	0.124	0.299	0.200
"	No. 104, ♀ 2.30.	23.5	28.5	40.0	0.116	0.384	0.269
"	No. 105, ♂ 2.10.	16.9	25.4	42.5	0.101	0.348	0.327
	(Average)	21.2	24.5	35.3	0.108	0.337	0.245

It is apparent from Tables I and II that insulin causes a decrease of lactic acid in the fasting animals, while the administration of a large amount of glucose rather tends to increase lactic acid. It should be concluded, therefore, that the action of insulin on the blood lactic acid content is greatly modified by the nutritional condition of the animal. The reason why the presence of excess of sugar tends to increase the lactic acid content in blood is difficult to answer at present. But it may be interpreted in the following way. Namely, the breakdown of glucose into lactic acid and the latter into CO_2 and water may be regulated by different enzymatic processes. When the rate of the first phase is retarded by insulin and the second is not, then the lactic acid decreases. This is the usual effect of insulin action upon the fasting animal. In the presence of an excess of sugar, however, the splitting of glucose into lactic acid occurs in so pronounced a manner that it can not be covered by the reverse action of insulin.

As was already depicted by Cori the doses of insulin have a great influence upon the blood lactic acid. Its abnormal increase in the case of insulin convulsion is naturally expected because the convulsion causes the oxygen deficit in the tissue, which leads to the accumulation of lactic acid.

Experiment 2.

The effect of insulin upon blood phosphorus.

Though it was definitely proved by many investigators that insulin hypoglycemia is always accompanied by the fall of blood inorganic phosphorus, the experiment was repeated with the purpose to investigate whether this is the case when the insulin convulsion has set in.

If the action of insulin is understood to promote the synthesis first of hexose phosphate and then of glycogen, the fate of lactic acid in the blood should be affected in the same way by blood phosphorus.

Comparing Tables I and III we find that the changes in the content of blood lactic acid and phosphorus really run parallel under the action of insulin. In normal hypoglycemic doses both

TABLE III.

The effect of insulin upon sugar and phosphorus in blood. The blood samples were collected before the convulsions had supervened; in some cases (No. 68 and 69), however, blood samples were collected after the convulsion had set in.

Date of Exp. s.	Rabbit's Nos., sexes and body weights.	Inorganic phosphorus		Blood sugar		Insulin used in units
		Before insulin mg %	$\frac{3}{4}$ -1 $\frac{1}{2}$ hrs. after insulin	Before insulin mg %	$\frac{3}{4}$ -1 $\frac{1}{2}$ hrs. after insulin	
22/II. (1927.)	kg. No. 62, ♀ 2.53	5.07	3.33	0.110	0.056	10
23/II.	No. 63, ♂ 2.41	4.13	3.39	0.130	0.090	„
2/III.	No. 64, ♀ 1.77	4.28	3.43	0.135	0.062	„
7/III.	No. 65, ♀ 2.21	5.26	3.33	0.113	0.073	„
8/III.	No. 66, ♀ 2.11	4.98	2.78	0.119	0.083	„
13/III.	No. 67, ♀ 2.00	4.58	4.17	0.124	0.105	„
	(Average)		3.41		0.078	
5/III.	No. 68, ♂ 2.16	4.12	4.67	0.126	0.062	„
7/III.	No. 69, ♀ 2.24	3.01	4.07	0.110	0.088	„
	(Average)	4.42	4.37	0.121	0.075	

decrease, but in convulsive doses they rather increase.

When the animal was administered orally with 50 cc. of 20 p.c. glucose per kg. of body weight about one hour before insulin injection, the inorganic phosphorus in blood showed the values given in Table IV.

TABLE IV.

Date of Exp. s.	Rabbit's Nos., sexes and body weights.	Inorganic phosphorus			Blood sugar		
		Before sugar adm.	an hour after sugar	an hour after insulin	Before sugar adm.	an hour after sugar	an hour after insulin
23/I. (1927.)	kg. No. 60, ♀ 1.73	4.95	4.63	4.35	0.114	0.158	0.066
„	No. 61, ♀ 1.70	5.72	4.92	4.14	0.107	0.173	0.083
	(Average)	5.34	4.78	4.25	0.111	0.166	0.075

(The units of insulin Tronto used were 35 for No. 60 and 45 for No. 61.)

In this case the insulin injection caused a slight decrease of blood phosphorus, while the lactic acid rather increased as was proved in the foregoing experiment. From this result it seems plausible that the lactic acid in the animal body is produced partly from hexosephosphate and partly from glucose itself. Perhaps insulin exerts an influence only upon the former process, thus facilitating the combustion of glucose in the muscle where carbohydrate can be burned through the intermediate formation of phosphoric ester. But in other tissues, glucose can be burned more easily than its phosphoric acid ester. Here insulin seems to exert no influence. Therefore the splitting of glucose molecule into lactic acid proceeds at an increased rate when the tissues are supplied with an abundance of glucose. This is the reason why the lactic acid content in blood increased in the presence of an excess of sugar in spite of the insulin administration. The idea can be well supported by the fact that the insulin convulsion can be easily released by glucose injection but not by hexose phosphoric acid ester.

Experiment 3.

The effect of epinephrine injection upon lactic acid and phosphorus content in blood.

It has been unanimously proved by Cori (1925), Collazo and Supniewski (1924) and Matsuoka (1928) that adrenalin hyperglycemia is always accompanied by the increase of lactic acid in blood.

This was also substantially proved by the author, as is shown in Table V.

With regard to the effect of epinephrine upon the phosphorus content in blood the reports in the literature are not altogether concordant. Perlzweig, Latham and Keefer (1923) and Allan, Dickson and Markowitz (1924) reported that the administration of epinephrine causes a decrease in the inorganic phosphate of blood and urine similar to that caused by the administration of insulin or by the ingestion of sugar. Matsuoka (1928), on the contrary, has observed that epinephrine causes a decided

TABLE V.
The effect of epinephrine injection upon blood lactic acid.

Date.	Rabbit's Nos., sexes and body weight.	Lactic acid (mg %)		Epinephrine (1:1000) used cc.
		Before injection	1 hour after injection	
12/III, (1928.)	kg. No. 106, ♂ 1.95	23.7	76.6	1.5
"	No. 107, ♂ 2.55	16.1	89.0	"
"	No. 108, ♀ 1.85	13.3	55.0	"
"	No. 109, ♀ 2.00	18.9	45.5	2.0
"	No. 110, ♀ 2.40	47.8	58.0	1.5
	(Average)	24.0	64.8	

rise in the inorganic phosphate of blood.

The author carried out a careful experiment in this line. The results are summarised in Table VI.

TABLE VI.
The effect of epinephrine upon inorganic phosphorus and sugar in blood.

Date of Exp. s.	Rabbit's Nos., sexes and body weights.	Inorganic phosphorus		Blood sugar		Epi- nephrine used in cc.
		Before injection	1-2 hrs. after inj.	Before injection	1-2 hrs. after inj.	
16/VII, (1927.)	kg. No. 70, ♀ 2.36	5.92	4.39	0.097	0.219	2
17/VII.	No. 71, ♀ 2.05	5.75	5.65	0.130	0.250	"
20/VII.	No. 72, ♀ 2.25	4.66	5.21	0.120	0.380	"
21/VII.	No. 73, ♀ 1.90	—	—	0.101	0.182	0.5
23/VII.	No. 74, ♀ 1.95	4.76	—	0.122	0.261	"
"	No. 75, ♂ 2.17	6.37	7.14	0.115	0.201	"
28/VII.	No. 76, ♂ 2.27	7.24	6.21	0.119	0.240	"
	(Average)	5.78	5.72	0.115	.248	

As is obvious from Table VI, the decrease in inorganic phosphate after epinephrine injections was not so apparent and in some cases (No. 72 and 75), on the contrary, even a slight rise was observed.

The fact can be well understood when we assume that epinephrine has no significant influence upon the equilibrium between glucose and phosphoric acid, but since it mobilises glycogen leading to hyperglycemia, the production of lactic acid increased just as in the case of glucose administration in the foregoing experiment.

Experiment 4.

The effect of phlorhizin upon the lactic acid and phosphorus content in blood.

Collazo and Spniewski (1924) observed a marked fall in lactic acid content in blood by subcutaneous injection of the glucosid, amounting only to 10 mg. The author repeated the same experiment with larger doses of phlorhizin. Namely 2 gm. of the glucosid were dissolved in 14 cc. of olive oil and injected hypodermically into a rabbit. The results are indicated in Table VII.

TABLE VII.

Date	Rabbit's Nos., sexes and body weights.	Lactic acid	
		Before phlorhizin	1 hour after inj.
11/III, (1928.)	kg. No. 111, ♀ 2.37	27.4	23.9
"	No. 112, ♂ 2.12	22.4	11.0
"	No. 113, ♀ 1.99	19.5	14.2
"	No. 114, ♂ 2.03	19.5	16.7
"	No. 115, ♀ 2.48	12.3	15.4
	(Average)	20.2	16.2

Since phlorhizin inhibits the combustion of glucose in the animal body, it naturally leads to the decrease of lactic acid. This fact was clearly demonstrated in the above experiment.

As to the fate of blood phosphorus under the influence of phlorhizin, Allan and his coworkers (1924) observed that its injection caused a slight initial decrease followed by a large increase in phosphate excretion, and that repetition of the injection resulted in a continuous high out-put of phosphorus amounting to two or

three times the normal, while a decided decrease in the excretion of phosphorus was followed, when the injection was stopped, probably because of the depletion of the source of phosphate during the diabetic period.

In this line the author also carried out an experiment on rabbits, the results of which are summarised in Table VIII. Here, phlorhizin was administered hypodermically, every 1 gm. of it dissolved in 20 cc. of 2.4 p.c. Na_2CO_3 solution or in 7 cc. of olive oil.

TABLE VIII.

The effect of phlorhizin on inorganic phosphorus and sugar in blood.

Date	Rabbit's Nos., sexes and body weights.	Inorganic phosphorus		Blood sugar		Phlorhizin used gm
		Before inj.	1-4 hrs. after inj.	Before inj.	1-4 hrs. after inj.	
10/IX, (1927.)	kg. No. 78, ♀ 1.67	5.81	4.81	—	—	1
12/IX.	No. 79, ♀ 1.72	5.62	4.22	—	—	2
16/IX.	No. 80, ♂ 2.28	4.15	4.50	—	—	"
24/IX.	No. 81, ♀ 1.64	3.40	3.14	0.126	0.174	"
25/IX.	No. 82, ♂ 1.94	3.79	3.30	0.123	0.186	"
28/X.	No. 83, ♂ 2.08	5.75	5.28	0.130	0.130	1
29/X.	No. 84, ♀ 2.05	5.05	5.20	0.131	0.177	2
31/X.	No. 85, ♀ 1.77	5.68	4.20	0.150	0.204	"
	(Average)		4.33	0.132	0.174	

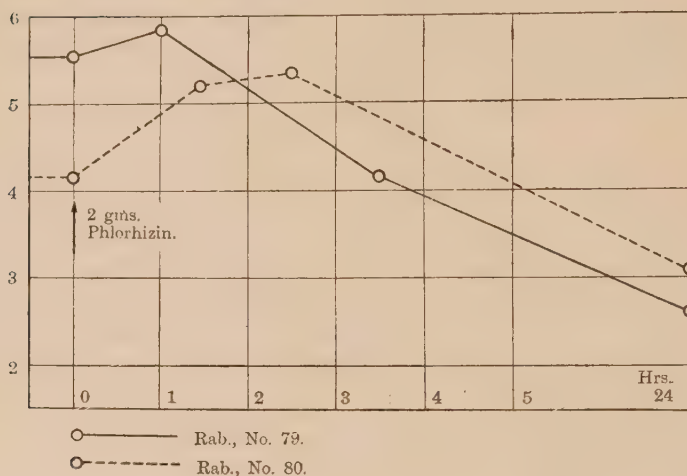
Control experiments, in which 20 cc. of 2.4 p.c. Na_2CO_3 only was given to animals.

16/IX.	No. 86, ♀ 2.19	4.37	3.80	—	—	—
24/IX.	No. 87, ♂ 1.88	3.09	2.90	—	—	—
	(Average)	4.67	3.35			

The results of the above experiments reveal that the inorganic phosphorus in blood show a tendency to decrease in the main, though in a few cases the reverse is the case. As this discrepancy might be ascribed to the time at which the blood was withdrawn, the change of blood phosphorus content was followed by time.

Two typical examples are illustrated in the following figure.

Fig. 1.
Changes in inorganic phosphate of blood found in
phlorhizin experiments.



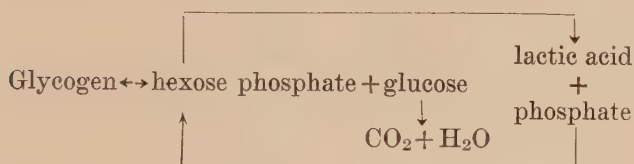
It is apparent from the above figure that the inorganic phosphorus in blood showed a slight increase soon after the phlorhizin injection and then a gradual decrease with time. Perhaps the increased permeability of the kidney for inorganic phosphorus as well as for glucose might be responsible for this decrease.

GENERAL DISCUSSION.

There is no more question that insulin hypoglycemia is accompanied by hypophosphatemia, which was first noticed by Wigglesworth, Woodrow, Winter and Smith (1923) and later confirmed by numerous authors.

As to the changes in lactic acid, occurring after the injection of insulin, it is concluded that insulin has no effect on the breakdown of glucose into lactic acid. It is justifiable to consider that a rise in lactic acid after insulin administration depends, not on the direct action of insulin itself, but on the convulsions which supervene thereby. From the figures in inorganic phos-

phate, sugar and lactic acid in blood, it may be concluded that the action of insulin is mainly in promoting the reaction in the direction to the left, in the following schematic representation of carbohydrate metabolism in animal organism, although a little rise in respiratory metabolism or sugar combustion can not be excluded.



The explanation of lactic acid decrease after insulin administration may, reasonably, be sought in two directions; the one being increased combustion of lactic acid, and the other the predominance of the reaction in the direction of glycogen resynthesis. Indeed, the increase in Embden's ester by insulin was substantially proved by the author. The results obtained by Bickel and Collazo (1923), Bissinger, Lesser and Zipf (1923), Lesser and Bissinger (1926), Cori, Cori and Pucher (1923), Cori (1924) and Best, Hoet and Marks (1926), Best, Dale Hoet and Marks (1926) and Matsuoka (1928), in which it was reported that the large part of the sugar added to, or preexisting in blood which disappears from circulation following the injection of insulin, is stored as glycogen in some tissues as liver or muscle, favour this hypothesis. The increased combustion of lactic acid under the influence of insulin has not yet been surely proved. (Meyerhof.)

An increase in lactic acid and the tendency of increase in inorganic phosphate, found in cases of insulin convulsions, may be assumed as indicating that the direction of the reaction in this stadium is the reverse of what occurs in the preliminary stadium of insulin action.

Further we must conceive that convulsion causes oxygen deficit in the tissues which leads to the increased output of lactic acid.

A slight decrease in the inorganic phosphate of blood was

found after the ingestion of sugar and this fall becomes more intense when insulin is injected successively.

That the ingestion of sugar causes changes in the phosphate excretion in urine similar to those found after insulin administration has previously been noticed by Fiske (1921) and Allan and Sokhey (1924), and this must be nothing else but stimulation of the internal secretion of insulin by the sugar and thus the reaction proceeds in a direction analogous to that in insulin injection.

The lactic acid concentration of blood increases after glucose ingestion, and this increase grows steadily even under the action of insulin.

Since it is improbable that insulin promotes the reaction of splitting of glucose into lactic acid, it should be concluded that there is a glycolytic process which stands outside the influence of insulin and proceeds in active manner when excess of sugar is supplied.

Regarding the action of epinephrine, it seems to be settled beyond question that this hormone causes an increase in the lactic acid of the blood. (Cori, 1925; Collazo and Supniewski, 1924; Matsuoka, 1928 and many others.) As to the glycogenolytic action of the hormone, there have been issued too many works to cite here.

The action of epinephrine is generally assumed as promoting the reaction in a direction reverse to that of insulin, i.e., antagonistic to insulin. With regard to the inorganic phosphate, however, the action of epinephrine is not entirely antagonistic as Allan and his collaborator (1924) and also others have pointed out. In the present work the rise and fall of inorganic phosphate was not constant after the injection of epinephrine, though it resulted in a slight decrease in the average value. Typical examples illustrating the changes in inorganic phosphate of blood after epinephrine administration are given in fig. 2 and 3.

The action of epinephrine, therefore, may be understood as follows:—It causes the rise of blood lactic acid merely as the result of hyperglycemia, as in the case of insulin experiments in which hyperglycemia was produced by the previous administration

Fig. 2.

Changes occurring in sugar and inorg. phosphate in blood,
found in epinephrine experiments.

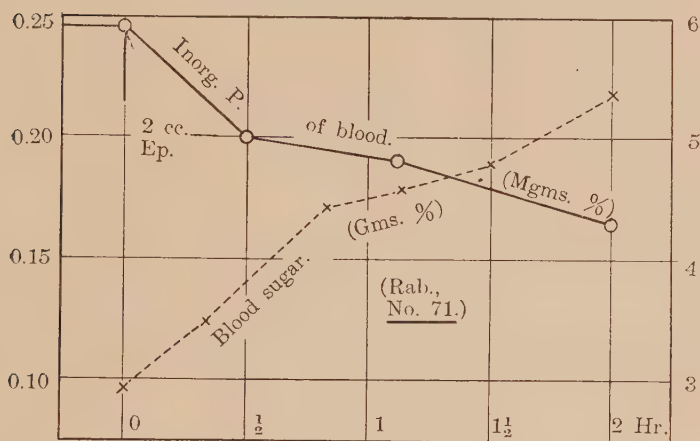
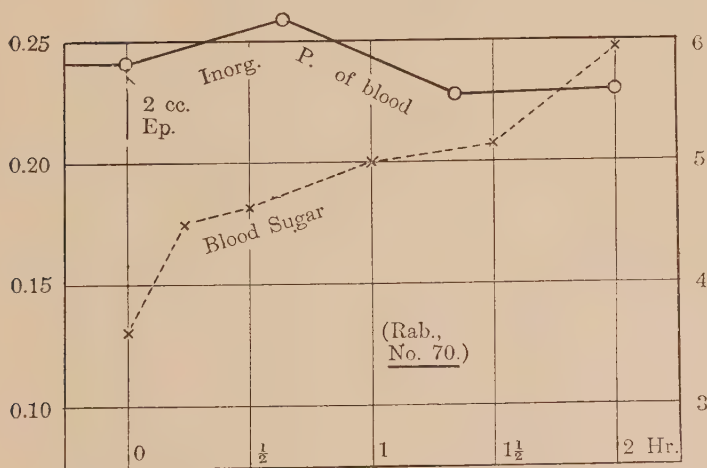


Fig. 3. The same as fig. 2.



of glucose to the animal.

According to Allan and others epinephrine causes decreased excretion of phosphate in the urine. What becomes of this retained phosphate is to be investigated, since no increase in inorganic phosphate of blood was observed.

It is settled far beyond question that phlorhizin causes temporary prohibition of glucose oxidation and certain disturbance in the permeability of kidney.

The decrease in blood lactic acid, caused by phlorhizin, may naturally be explained by the failure of breakdown of glucose.

The decrease in blood phosphate which follows the phlorhizin injection, sooner or later, is probably attributable to the increased permeability of kidney for inorganic phosphate.

That the hyperglycemia observed in phlorhizin experiments is not a true one but a false hyperglycemia, due to the high sensitiveness of the reagent to the cleavages of the glucoside, when Hagedorn-Jensen technique was used for the estimation of blood sugar, has been reported by the author (1932).

CONCLUSION.

1. Insulin has no effect on promoting the reaction
glucose \leftrightarrow lactic acid
in the direction to the right.
2. It is, therefore, concluded that the rise in blood lactic acid which occurs after the administration of insulin, is due not to the direct action of insulin itself but to the convulsions that intervened.
3. Epinephrine causes a decided rise in the blood lactic acid of rabbits.
4. Phlorhizin causes a slight decrease in blood lactic acid, probably as a result of prohibition of glucose oxydation.

Part II.

The Effect of Insulin, Epinephrine and Phlorhizin on the Distribution of Phosphate in the Blood of Rabbits.

Recently the significance of the phosphoric acid in the metabolism of carbohydrate of vegetable and animal organism has been much elucidated by many investigators. For instance, it is a well known fact that in the form of hexosephosphates it plays a fundamental role in apparently divergent vital processes such as yeast fermentation, muscle contraction and the ossification of cartilage.

Further, recent works of Embden and his associates (1927), Eggleton and Eggleton (1927-28, and 1931), Fiske and Subbarow (1927 and 1929), Lohmann (1928 and 1929) and many other authors have made valuable contribution to the function of phosphoric acid. Namely, phosphagen, a creatine phosphoric acid, was discovered by Eggleton and Eggleton and was assumed to play an important rôle in muscle contraction. Lohmann (1928) isolated from muscle adenylic pyrophosphate, which acts as coenzyme in glycolysis in muscle and as cozymase in alcoholic fermentation. It has also been confirmed by Deuticke (1930) that adenylic pyrophosphate serves as coenzyme for the dehydrogenation of hexose phosphate. In this concern Tsukano (1931) observed that an organic phosphorus compound isolated from suprarenal cortex, is of essential importance for the dehydrogenative oxydation of hexose phosphates.

It can be assumed, therefore, that phosphoric acid plays a fundamentally important rôle in carbohydrate metabolism in organism. Then it seems very interesting to study what an influence insulin, epinephrine and phlorhizin exert, all of which are known to have direct bearing with the carbohydrate metabolism, on the behavior of those phosphates in animal tissue.

The present paper deals with such hormonal effect on the distribution of those phosphates in blood.

METHODS.

Rabbits were used throughout the experiments. To lessen the

error due to the individuality of the animal, a series of various phosphate determinations were carried out on the same animals. The data in the tables give the average value of 6 determinations.

The determination of various kinds of phosphoric acid compounds, namely, inorganic phosphorus, phosphagen, pyrophosphate and hexose monophosphate together with adenylic acid were carried out by Lohmann's method (1928). Total phosphorus was determined by Fiske-Subbarow's method (1925). For hexose monophosphate, Embden's reduction method was also tried.

Briefly summarized, the whole procedure of these estimations runs as follows:—7 cc. of oxalated blood, collected from ear vein under ice cooling, was transferred to an Erlenmeyer flask, which contained 33 cc. of 7 p.c. trichloroacetic acid solution cooled at ice temperature. After being shaken vigorously a few times, the precipitate was filtered off rapidly through a filter paper.

Orthophosphate: 7 cc. of this filtrate was measured into a hard glass centrifuge tube (1.5×10 cm.), and mixed with 1 cc. of 5 p.c. ammonia and 2 cc. of Mathison reagent. After 24 hours standing, the tube was centrifuged and the supernatant fluid was gently sucked off. The precipitate was then washed with 8 cc. of 1 p.c. ammonia. To the precipitate were added 2 cc. of 2.5 p.c. ammon molybdate in 5 n. sulphuric acid, 0.4 cc. of 0.25 p.c. aminonaphtholsulphonic acid solution and enough water to make the whole volume up to 10 cc. After being well mixed, the tube was put in a thermostat kept at 37°C for 5 minutes, and the colour developed was matched against the standard solution, which corresponds to 0.1 mg of P. in 25 cc.

Phosphagen: 5 cc. of the trichloroacetic acid filtrate was immediately added with molybdate reagent as described above and the colour developed was compared against the same standard as above, with the only modification that this was developed in the presence of the same concentration of trichloroacetic acid as in the test solution. The value thus obtained represents the sum of orthophosphate preexisting and that derived from phosphagen. The latter can, therefore, be easily calculated by subtracting the former value from that found.

Pyrophosphate and hexose monophosphate: 2 cc. of the trichloroacetic acid filtrate was measured into each of four centrifuge tubes (1.5×10 cm), and mixed with 2 cc. of 2 n. HCl. Under reflex condenser, they were put in the boiling water bath. At the end of 7, 15, 30 and 180 minutes, respectively, one of them was taken out from the bath, cooled under the tap water and the free inorganic phosphate in each tube was determined in the usual manner. In this case the standard solution was so chosen as to contain, per 25 cc. 5 cc. of 2 n. HCl and 5 cc. of 5.8 p.c. trichloroacetic acid to let the colour develop under the same condition of acidity as in the test solution. Let b, b', c and d represented the value of 7, 15, 30 and 180 minutes' hydrolysis respectively, so (b-a) is the value corresponding to pyrophosphate, where a is the direct estimable P., i.e., orthophosphate-P. plus phosphagen-P. (According to Lohmann b and b' must not differ in wide extent.)

The value of lactacidogen (hexose monophosphate) is given by $\frac{(d-b) \times 100}{23}$, as this after Lohmann, liberates 22.7 p.c. of its phosphorus during 3 hours' hydrolysis, while adenylic acid remains intact. In the later experiments 15 minutes hydrolysis was omitted.

Lactacidogen (hexose monophosphate) estimation with Embden's method was carried out as follows:—

6 cc. of the trichloroacetic acid filtrate was neutralised with light magnesia in the hard glass centrifuge tube. After centrifuging, 4 cc. of the clear supernatant fluid was measured into the other tube. After the addition of each 5 cc. of absolute alcohol and of ammon alcohol, the tube was let stand for 2 hours at ice temperature. Then the tube was centrifuged for 15 minutes, at 3000 revolutions per minute. The supernatant fluid was decanted off. The precipitate was then dissolved with some water and reprecipitated in a similar manner as above. The tube with the precipitate was placed in the sulphuric acid exsiccator, evacuated and dried. Then the precipitate was dissolved by means of 2 cc. of n/10 HCl and diluted with 2 cc. of water. After complete dissolution, 4 cc. of n/20 Na_2CO_3 solution and furthermore 4 cc. of

water were added. On this solution Hagedorn-Jensen's method was applied to determine the reducing activity of hexose monophosphate. Since, according to Embden this gives the reduction value corresponding to $\frac{2}{3}$ of glucose, so, its amount and consequently lactacidogen-P. can easily be calculated.

Total phosphorus: 1 cc. of the trichloroacetic filtrate was transferred into a hard glass test tube (1.5×20 cm), mixed with 0.5 cc. of 10 n. sulphuric acid and submitted to wet ashing after Fiske-Subbarow's description. Then 2 cc. of 2.5 p.c. aqueous ammonium molybdate solution was added and the colour developed was matched against the standard, which was produced by treating the given phosphate solution in an exactly similar manner as the test solution.

RESULTS OF EXPERIMENTS

1. *Distribution of phosphates in normal blood.*

In the first place the author investigated the distribution of phosphates in blood of normal animals. One group of animals, which were nourished by "Okara" and fasted during the day before the experiment, were chosen for this purpose. The results are summarised in Table I.

TABLE I.
Distribution of phosphates per 100 cc. of blood of normal animals.

Experiments.	Exp. No.	Inorg. P. mg.	Phosphagen P. mg.	Pyro-P. mg.	(d-b) mg.	Embden's ester mg.	P. of hexose mono-phosphate plus insoluble esters. mg	Total P. mg.
Control	1.	2.52	0.36	5.59	3.39	5.82	30.73	39.2
	2.	2.45	0.39	5.26	3.35	4.25	28.90	37.0
	3.	2.89	0.34	5.11	3.11	4.63	32.46	40.8
	4.	3.05	0.38	5.96	4.21	4.95	29.61	39.0
	5.	3.43	0.37	5.67	4.30	4.32	29.73	39.2
	6.	4.45	0.26	5.87	4.38	4.77	28.82	39.4
	Average	3.13	0.35	5.59	3.79	4.79	30.04	39.1

As is visible from table I, the average value of orthophosphate was 3.13 mg per 100 cc. of blood, varying from 2.52 to 4.45 mg. Eggleton and Eggleton (1927) have stated that "it should be mentioned that Bell and Doisy (1920) probably found traces of phosphagen in blood, for they state that the inorganic phosphate must be determined in the trichloroacetic acid filtrate as soon as possible after filtering since the acid hydrolyses the organic phosphate on standing, giving too high results." More recently they (1929-1930) reported that the blood samples obtained from four different vertebrates (dog, human, rabbit and cat) contained no traces of phosphagen. The above noted increase in inorganic phosphate by the acid, therefore, may be attributed to the cleavage of pyrophosphate by the acid. These authors, with their new principle, obtained the following results from the blood of rabbit and dog.

	Ortho-P. mg.	Phosphagen-P. mg.	Pyro-P. mg.	Insoluble P. mg.	Soluble esters. mg.	Total P. mg.
Dog.	6.0	0	2.0	17.5	1.0	26.5
Rabbit.	5.1	0	(19.7)		3.5	28.3

Comparing this data with the results of the author's experiments we find that the value of inorganic phosphate is high and those of soluble esters (hexose monophosphate) and total phosphate are much smaller. This may be traced back to the unsatisfactory extraction and low concentration of trichloroacetic acid used in their experiments. Nakamura (1929) found 34.5 mg P. as an average per cent value of 15 rabbits for total phosphate. The method of Lohmann and of Embden for the determination of hexose monophosphate did not give the same result.

If Lohmann's calculation ($\frac{(d-b) \cdot 100}{23}$) is applied, it amounts to about three times as much as that obtained by Embden's method. The low rate of reduction of this substance may be partly responsible for the small value by Embden's method.

Robinson's ester, which according to Lohmann is almost identical with Embden's ester, has only about $1/3$ of the reducing power of glucose (Robinson, 1930).

The value of insoluble esters plus hexose monophosphate was obtained, by subtracting the sum of inorganic phosphate, phosphagen and pyrophosphate from total phosphate. The insoluble esters probably indicate adenylic acid (and inosinic acid).

The investigations as to whether there might be some phosphorus compounds, which may be extracted with ether, resulted negatively. It may, therefore, be concluded that the trichloroacetic acid filtrate of blood does not contain any traces of phosphatides.

2. *Insulin experiments.*

There is no more question as to the fact that insulin causes a marked decrease in inorganic phosphate of blood. In this respect, Eadie, Macleod and Noble (1925) and Chaikoff and Markowitz (1925) have noticed that this decrease runs parallel to the blood sugar, but in the recovery phase the phosphate appears to rise earlier than the sugar. It has, however, been observed by the present author in his unpublished work that marked reincrease often occurs in a short time after the injection of insulin, as a prodrome of convulsion.

In the next experiment the study was made on the behavior of the various phosphorus compounds in the blood of the animal rendered hypoglycemic or convulsive by the action of insulin. The whole experimental procedure was indicated in the following Table II, and its results are summarised in Table III.

A similar experiment was repeated on the rabbit, which was rendered hyperglycemic by administering 50 cc. of 20% glucose solution per kg. of body weight. The results are given in Table V.

From the above results we can perceive that the inorganic phosphate of blood, once decreased by the action of insulin, rises again when convulsion has set in, while hexose monophosphate increases in hypoglycemic stadium and decreases in convulsion. With regard to the pyrophosphate, a slight decrease occurred after

TABLE II.
Experiments of insulin administration (17/VI, 1931).

Animal No.	Time of insulin adm.	Insulin (Tronto) used. units.	First venesection.	Further adm. of insulin.	Insulin (Lily) administered. units.	Beginn of conv.	Second venesection.
7.	9.07 a.m.	50 (intraven)	9.45 a.m.	1.20 p.m.	120 (subcut.)	2.45 p.m.	4.45 p.m.
8.	9.10 „	„	9.55 „	—	—	12.10 „	12.15 „
9.	9.13 „	„	10.15 „	1.20 p.m.	120 (subcut.)	2.30 „	3.05 „
10.	9.15 „	50 (subcut.)	10.30 „	—	—	12.40 „	2.15 „
11.	9.16 „	„	11.00 „	—	—	11.10 a.m.	12.15 „

Notes. Animal No. 7 died of convulsion, No. 8 later recovered, No. 9 died of convulsion, at 4.50 p.m., No. 10 died of convulsion, while under venesection, and No. 11 died of convulsion about 3 hours after the second venesection.

TABLE III.
The distribution of phosphates in the blood of the first venesection of insulin rabbits.

Experiment.	Exp. No.	Inorg. P. mg.	Phosphagen P. mg.	Pyro-P. mg.	(d-b) mg.	Embden's ester. mg.	P. of hexose monophosphate plus insoluble esters. mg.	Total P mg.
Insulin (no conv.)	22.	1.31	1.00	4.88	5.81	4.82	30.61	37.8
	23.	1.43	1.05	5.11	6.21	7.39	28.11	35.7
	24.	1.32	1.12	4.85	5.51	4.58	30.11	37.4
	25.	1.75	0.69	4.95	5.71	4.82	33.41	40.8
	26.	1.62	1.04	5.63	6.01	4.16	31.41	39.7
	Average	1.49	0.98	5.08	5.85	5.15	30.73	38.3

insulin injection, but it showed a tendency to rise again when convulsions had set in.

From these results it seems very likely that insulin promotes the synthesis of the hexose monophosphate at the expense of sugar, inorganic phosphate and pyrophosphate, and since this substance has lower reducing activity than glucose the apparent hypoglycemic

TABLE IV.

Distribution of phosphates in blood of insulin rabbits, after the convulsion had set in.

Experiment.	Exp. No.	Inorg. P. mg.	Phosphagen P. mg.	Pyro-P. mg.	(d-b) mg.	Embden's ester. mg.	P. of hexose monophosphate plus insoluble esters. mg.	Total P. mg.
Insulin (after conv.)	27.	2.86	1.30	4.57	4.47	4.58	25.92	34.6
	28.	3.54	0.80	5.16	4.70	7.45	26.20	35.7
	29.	3.02	1.23	4.45	3.70	4.23	23.50	32.2
	30.	3.91	0.62	5.97	6.00	4.02	33.60	44.4
	31.	3.16	1.04	6.20	6.10	4.31	32.90	43.0
	Average	3.30	1.05	5.27	4.99	4.92	28.44	38.0

TABLE V.

Distribution of phosphates in blood of glucose-insulin rabbits. of body weight.

Experiment.	Exp. No.	Inorg. P. mg.	Phosphagen P. mg.	Pyro-P. mg.	(d-b) mg.	Embden's ester. mg.	P. of hexose monophosphate plus insoluble esters. mg.	Total P. mg.
Insulin (after glucose adm.)	12.	1.76	0.28	6.01	3.42	5.01	19.85	27.9
	13.	2.07	0.40	5.65	3.66	4.17	22.88	31.0
	14.	2.59	0.50	6.34	4.29	4.51	23.17	32.6
	15.	2.46	0.45	6.51	4.55	4.32	23.28	32.7
	16.	2.67	0.54	7.04	5.00	4.76	25.75	36.0
	Average	2.31	0.43	6.31	4.18	4.55	22.97	32.0

condition of blood under the action of insulin may be partly accounted for by its formation.

The decrease in blood lactic acid by insulin, observed in the experiments under part I, is due largely to the decrease of blood sugar, because, when excess of sugar exists, blood lactic acid steadily increases even under the action of insulin.

It may be concluded, therefore, that insulin accelerates the

hexose monophosphate synthesis and has no effect on the process of glycose \rightarrow lactic acid.

This stands quite in agreement with the observation of Marks and Morgan (1927) that insulin convulsion can be released promptly by glucose injection but not by hexose phosphates.

3. *Epinephrine experiments.*

It has been reported by some authors that epinephrine causes similar changes in inorganic phosphate of blood and urine as insulin. Perlzweig and his associates (1924) reported that subcutaneous injections of this hormone in normal human subjects caused a fall in inorganic phosphate of blood, and a simultaneous fall in the rate of excretion of phosphate into urine, though frequently there was a rise in the rate of urinary excretion of phosphate. The results obtained by Adlan, Dickson and Markwitz (1924)- indicate that the administration of epinephrine on fasting animals causes changes in the excretion of inorganic phosphate into urine similar to those caused by the administration of insulin or by the ingestion of sugar, namely an initial decrease followed by a large increase, and they state that "as epinephrine and insulin are commonly regarded as having an antagonistic action, on some phases of carbohydrate metabolism, it appears paradoxical, that epinephrine should affect the phosphate excretion in almost exactly the same manner as insulin. Epinephrine and insulin are not, therefore, antagonistic in their effects on these processes of carbohydrate metabolism, with which phosphate is concerned." Bollinger and Hartmann (1925), Kurokawa (1924, 1925) and Eadie, Macleod and Noble (1925) also confirmed these results, though Matsuoka (1928) reported a marked increase in inorganic phosphate of blood after the injection of epinephrine.

The author carried out a careful experiment in this line and further investigated to what extent epinephrine acts antagonistic to insulin on factors other than inorganic phosphate. The results are summarised in table VI.

As is visible from table VI, the inorganic phosphate was ap-

parently decreased in two experiments, but in the remaining three it rose rather than the control, thus it resulted in 2.75 mg p. c. on an average, which was found lower than that of control.

TABLE VI.
Distribution of phosphates in blood of epinephrine rabbits.
Epinephrine solution (1:1000) used was 1 cc. per kg

Experiments.	Exp. No.	Inorg. P. mg.	Phosphagen P. mg.	Pyro-P. mg.	(d-b) mg.	Embden's ester. mg.	P. of hexose monophosphate plus insoluble esters. mg	Total P. mg.
Epinephrine.	7.	1.10	0.94	5.83	2.33	4.32	20.63	28.5
	8.	1.10	1.04	5.97	2.59	4.25	23.56	31.7
	9.	4.02	0.40	6.18	2.40	4.43	20.90	31.5
	10.	3.64	0.49	6.62	3.05	4.17	24.97	35.7
	11.	3.88	0.53	6.69	3.70	4.50	25.10	36.2
	Average	2.75	0.68	6.26	2.81	4.33	23.04	32.7

This result coincides entirely with that obtained in the previous work, in which Bell-Doisy's method of phosphorus estimation was employed. Besides blood sugar and inorganic phosphate, epinephrine resulted entirely reverse to insulin, i.e., an increase in pyrophosphate and a fall in (d-b) factor.

Another significant change is the marked decrease in total phosphorus. Nakamura (1929) also observed it. According to Allan and others, epinephrine retards the excretion of inorganic phosphate into urine. Then the question occurs what is the cause of the decrease of total phosphorus. Cori (1931) has found an unmistakable rise in Embden's ester of muscle after the administration of epinephrine. Besides this, perhaps, the increase of pyrophosphate in tissues may be partially responsible.

4. *Phlorhizin experiments.*

An exactly similar experiment was undertaken with phlorhizin. The results are summarised in table VII.

As is evident from table VII, inorganic phosphate showed a

slight increase, while in the experiment of part I, it showed a slight decrease by phlorhizin. As is already described, this discrepancy is attributable to the difference of time at which venesection was performed. There was no significant change in pyrophosphate, but hexose monophosphate showed a slight increase.

From these results and those obtained under part I, it may be concluded that phlorhizin causes decrease in blood lactic acid, retarding the oxidation of glucose and hexose monophosphate. Yet it seems unlikely that phlorhizin has an influence on the process of carbohydrate metabolism with which phosphates are concerned.

TABLE VII.
Distribution of phosphates in the blood of phlorhizinised rabbits.

Experiments.	Exp. No.	Inorg. P. mg.	Phosphagen P. mg.	Pyro-P. mg.	(d-b) mg.	Embden's ester. mg.	P. of hexose monophosphate plus insoluble esters. mg.	Total P. mg.
Phlorhizin	17.	1.78	0.56	5.16	3.50	5.28	19.40	26.9
	18.	4.06	-0.12	5.31	5.15	4.43	25.35	34.6
	19.	3.49	-0.04	5.52	4.63	5.02	21.63	30.6
	20.	4.75	-0.10	5.12	4.84	4.06	21.73	31.5
	21.	4.30	0.23	5.59	5.43	4.95	24.28	34.4
	Average	3.67	0.11	5.34	4.71	4.75	22.42	31.6

Note.—Phlorhizin was used as a carbonate solution, dissolving 1 gm of the glucoside in 20 cc. of 2.4% Na_2CO_3 , and 25 to 40 cc. of this solution was administered subcutaneously.

DISCUSSION OF THE RÔLE OF PYROPHOSPHATE.

According to Lohmann and his associates (1931), pyrophosphate plays a fundamental rôle as co-enzyme in lactic acid formation from glycogen in muscle. Barrensheen and his collaborator (1931) confirmed that the glycolytic capacity of animal blood is proportional to the absolute amount of pyrophosphate in it.

After reviewing the data obtained in the present work, we are lead to conclude that blood pyrophosphate increases markedly when apparent hyperglycemia exists, as in the case of epinephrine injec-

tion or of glucose administration.

On the contrary it decreases in the hypoglycemic phase of insulin action, accompanied by a fall in blood lactic acid. These results favour the idea that pyrophosphate promotes the splitting of glucose into lactic acid.

From the results that insulin causes a decrease of pyrophosphate with the simultaneous rise of hexose phosphate, it seems very likely that pyrophosphate may be partly converted to hexose-phosphate. On the contrary pyrophosphate increases by epinephrine, at the expense of hexose monophosphate and insoluble esters. Also in the case of insulin experiment in which excess of glucose was previously supplied to the animal, it shows marked increase with a simultaneous fall in insoluble esters.

From these results it may be assumed that when the hyperglycemic condition prevails in the body, pyrophosphate is built up from other phosphorus compounds.

SUMMARY.

The results obtained in the experiment are summarized as follows.

1. Inorganic phosphate decreased under the action of insulin, but it rose again when hypoglycemic convulsion supervened. This decrease was not apparent when an excess of sugar had been administered.

Epinephrine did not cause a marked fall in inorganic phosphate.

2. The decrease in blood pyrophosphate occurred under the action of insulin, but it showed a tendency to rise again when convulsion had set in. Its increase was observed when the animal was rendered hyperglycemic by the administration of glucose or by the injection of epinephrine.

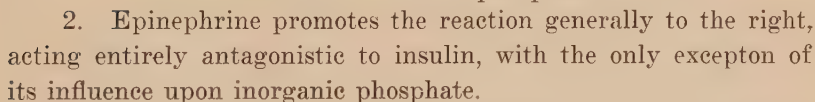
It remained fast constant by phlorhizin injection.

3. The hexose phosphate factor of Lohmann (d-b) and Embden's ester runs almost parallel in each case. The decrease in this factor occurred by the hypoglycemic convulsion of insulin, and under the influence of epinephrine.

4. Total phosphorus decreased markedly by epinephrine, phlorhizin and glucose administration.

From these results and those obtained in Part I, we have the conclusion as follows:—

(anaerobic)



4. In case of phlorhizin injection it is difficult to find any intimate participation of phosphates in the metabolic change occurring thereby.

REFERENCES.

- Allan, Dickson and Markowitz (1924): *Amer. J. Physiol.*, **70**, 333.
Banting and Best (1922): *J. Lab. and Clin. Med.*, **7**, 251; *Trans. Roy. Soc. Canada, Sec.*, **5**, 1922, **16**, 27.
Barrenschæen u. Vasarhelyi (1931): *Biochem. Zts.*, **230**, 330.
Bell and Doisy (1920): *J. Biol. Chem.*, **44**, 55.
Best, Dale, Hoet and Marks (1926): *ibid. B.*, **100**, 55.

- Best, Hoet and Marks (1923): Proc. Roy. Soc. (London), B., **100** 32.
 Bissinger, Lesser and Zipf (1923): Berl. Klin. Woch., **2**, 2233.
 Bickel and Collazo (1923): Deutsch. Med. Woch., **49**, 1408.
 Bissinger and Lesser (1923): Biochem. Zts., **168**, 398.
 Blatherwick, Bell and Hill (1924): Proc. Amer. Soc. Biol. Chem., **59**, 241.
 Briggs, Koechig, Doisy and Weber (1923-24): J. Biol. Chem., **58**, 721.
 Brugsch, Horsters and Kotz (1924): Biochem. Zts., **149**, 24.
 Burn and Dale (1924): J. Physiol., **59**, 164.
 Clausen (1922): J. Biol. Chem., **52**, 263.
 Collazo and Supniewski (1924): Biochem. Zts., **154**, 423.
 Cori, Cori and Pucher (1923): J. Pharm. and Exp. Therap., **21**, 377.
 Cori (1924): Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., **21**, 417.
 Cori (1924): *ibid.*, **21**, 419.
 Cori (1925): J. Biol. Chem., **63**, 253.
 Deuticke (1930): Zts. f. Physiol., **192**, 193.
 Dudley, Laidlaw, Trevan and Boock (1923): J. Physiol., **57**, 47.
 Eadie, Macleod and Noble (1925): Amer. J. Physiol., **72**, 614.
 Eggleton and Eggleton (1927): Biochem. J., **21**, 190; J. Soc. Chem. Ind., 1927, **46**, 485; J. Physiol., 1928, **65**, 15; J. Physiol., 1929, **68**, 193.
 Elias and Weiss (1922): Wion. Arch. inn. Med., **4**, 29.
 Embden and Laqueur (1914): Zts. f. Physiol. Chem., **93**, 94; 1917, **98**, 181; 1921, **113**, 1.
 Embden and Zimmermann (1924): Zts. Physiol. Chem., **141**, 225; 1927, **167**, 114, u. 137.
 Embden and Zimmermann (1927): Zts. f. Physiol., **167**, 137.
 Euler and Myrbäck (1924): Zts. Physiol. Chém., **136**, 107; 1925, **150**, 1; 1927, **165**, 28; 1927, **168**, 177; Naturw., 1929, **17**, 291.
 Fiske (1920): J. Biol. Chem., **41**, Proc., 59; 1921, **49**, 171.
 Fiske and Subbarow (1925): J. Biol. Chem., **66**, 375; 1929, **81**, 629; Science, 1927, **65**, 401.
 Friedemann, Cotonio and Schaffer (1927): J. Biol. Chem., **73**, 335.
 Hagedorn and Jensen (1923): Biochem. Zts., **135**, 46.
 Harden and Young (1906): Proc. Roy. Soc. (London): B (2), **78**, 369; 1908, **80**, 299; 1910, **82**, 321; 1911, **83**, 451; Biochem. Zts., 1912, **40**, 458; Proc. Chem. Soc., 1914, **30**, 16.
 Harrop and Benedict (1923): J. Biol. Chem., **58**, 483.
 Kellaway and Hughes (1923): Brit. Med. J., **1**, 710.
 Kuhn and Bauer, (1924): Münch. Med. Woch., **71**, 544.
 Kurokawa (1924-25): Tohoku J. of exp Med., **5**, 433.
 Lohmann (1928): Biochem. Zts., **202**, 463.
 Lohmann (1928): Biochem. Zts., **194**, 306; 1928, **196**, 3; 1928, **202**, 466; 1923, **203**, 161; 1928, **203**, 172; Naturw., 1929, **17** 624; 1931, **19**, 180.
 Lohmann and Meyer (1931): Biochem. Zts., **237**, 437.

- Matsuoka (1923): Nissin Igaku, 5.
- Mac Cormick and Macleod (1923): Tr. Roy. Soc. Can., Sect. 5. Ser. 3, 17, 63.
- Marks and Morgan (1927): Biochem. J., 21, 530.
- Matsuoka (1927-28): Nisshin Igaku., 17, 720.
- Meyer (1928): Biochem. Zts., 193, 139.
- Meyerhof (1919): Pflüger s. Arch., 175, 20 & 88; 1920, 182, 232 & 284; 185, 11; 1921; 188, 114; 191, 128; J. Gen. Physiol., 1927, 8, 531. Ergebnisse d. Physiol., 1923, 22, 328.
- Meyerhof, Lohmann and Meyer (1925): Biochem. Zts., 157, 459; 1931, 237, 437.
- Nakamura (1929): Mit. aus d. Med. Akad. Kyoto, 3, 217.
- Perlzweig, Latham and Keefer (1923): Proc. Soc. Expt. Biol. and Med., 21, 33.
- Robison and Morgan (1930): Biochem. J., 24, 119.
- Sokhey and Allan (1924): Biochem. J., 18, 1170.
- Sokhey and Allan (1924): Biochem. J., 18, 1170.
- Terada (1927): Naibunbitsugakn Zasshi, 2, 302.
- Tolstoi, Loebel, Levine and Richardson (1923-24): Proc. Soc. Exp. Biol. and Med., 21, 449.
- Tsukano (1932): J. Biochem., 15, 477.
- Wigglesworth, Woodrow, Winter and Smith (1932): J. Physiol., 57, 447.
- Winter and Smith (1924): Ibid., 18, 327.
- Wigglesworth, Woodrow, Winter and Smith (1923): J. Physiol., 57, 447.
- Yamada, S. (1932): J. of Biochem., 15, 311.

ÜBER DIE BEZIEHUNGEN DER ALIMENTÄREN HYPOGLYKÄMIE, SOWIE DES „STAUB“-EFFECTES ZU VERSCHIEDENEN ZUCKERARTEN.

VON

MASAO SAWADA.

*(Aus dem biochemischen Laboratorium des Präfektur-Hospitals
zu Kobe. Vorstand: Dr. M. Takeda.)*

(Eingegangen am 28. September 1932)

I. EINLEITUNG.

Staub (1921, 1922, 1926, 1927), hat experimentell konstatiert, dass Glukosezufuhr das Auftreten von Hypoglykämie im Anschluss an temporäre Hyperglykämie bedingt. Ferner hat er gefunden, dass wiederholte Zuckergabe die alimentäre Hyperglykämie allmählich vermindert. Später hat er klinisch durch Bluttransfusionsversuch nachgewiesen, dass das Blut des Gesunden im Verlauf der alimentären Hyperglykämie die Wirkung besitzt, den Blutzucker des Diabetikers herabsetzen zu können, was er auf Mehrbildung von Insulin zurückführte. Dabei hat er solche Fälle „Staub-Effekt positiv“ genannt, bei denen der maximale Blutzuckerwert nach späterer Zuckergabe niedriger ausfällt als nach früherer, und die umgekehrten Fälle „Staub-Effekt negativ.“

Darauffolgend ist eine Reihe von experimentellen Nachprüfungen über das Wesen der von Staub entdeckten Tatsachen sowie über die Blutzuckerregulation erschienen.

Pollak (1923, 1927) berichtet ein interessantes Experiment in bezug auf die alimentäre Hyperglykämie, nämlich: bei intravenöser Dauerinfusion von Zuckerlösung steigt der Blutzucker nur im Anfang, um sich dann allmählich zu vermindern; er kam zu der Schlussfolgerung, dass Zuckerzufuhr im Organismus den Blutzucker regulierende Vorgänge hervorruft.

Depisch und Hasenöhl (1926, 1928), haben auch beobachtet, dass sich der Blutzucker nach Zuckergabe zuerst vermehrt,

dann vermindert. Sie haben diese Erscheinung damit in Zusammenhang gebracht, dass die Zuckerzugabe im Körper Insulinproduktion auslöst. Sie haben ferner bestätigt, dass Zufuhr von Zucker und Insulin zusammen stärkere Hypoglykämie hervorruft, als alleinige Zugabe von Insulin und Wasser. Dadurch wurde der Beweis erbracht, dass Zuckereinverleibung Insulinproduktion im Gefolge hat. Auf Grund dieser Tatsache haben sie die Ansicht vertreten, dass die wiederholte Zuckerbelastung als die beste Funktionsprüfungsmethode der Langerhansschen Inseln der Pankreas anzusehen ist.

Koref und Rigler (1924), haben auch ähnliches festgestellt, nämlich, dass wenn man Zucker und Insulin zusammen injiziert, die Wirkung des Insulins stärker ist als bei alleinigem Gebrauch von Insulin. Diese Tatsache haben Adlersberg und Porges (1926) als Ausdruck der Summe der durch Zuckergabe bedingten endogenen Insulinsekretion und der exogenen Insulinwirkung erklärt.

Lennox (1927) beobachtete, dass sich der sog. Staub-Effekt im wiederholten Zuckerbelastungsversuch bei peroraler Zuckergabe stärker geltend macht als bei intravenöser Injektion; daraus ist die wichtige Rolle zu erkennen, die der Zucker bei der Beschleunigung der Blutzuckerregulation im Organismus spielt.

Hosaka (1924) teilte mit, dass wiederholte perorale Zuckerzufuhr bei gesunden Tieren die alimentäre Hyperglykämie immer schwächer ausfallen lässt, und dass bei gestörter Pankreasfunktion der Blutzuckerspiegel immer höher wird.

Nach den obigen Autoren ruft die Zuckerzufuhr eine stärkere Blutzuckerregulation hervor. Vor allem wird die Produktion von Insulin, des blutzuckerregulierenden Hormons, gesteigert, was zum Auftreten von alimentärer Hypoglykämie führt.

Es wird daher allgemein anerkannt, dass die alimentäre Hyperglykämie immer schwächer ausfällt, wenn mehrmals hintereinander Zucker gegeben wird. Wenn man vorher normale Tiere mit Traubenzucker belastet—sei es per os oder sei es intravenös—, so wird die Blutzuckerregulationsfunktion im Organismus gefördert und führt vor allem zu einer Überproduktion von Insulin,

dann nach gewisser Zeit zum Auftreten von Hypoglykämie, und bei wiederholter Zuckerbelastung kommt positiver Staub-Effekt vor.

Somit muss man, um zu wissen, ob eine gewisse Substanz die Zuckerassimilation befördert oder nicht, vorher sicherstellen, ob sich hypoglykämische Erscheinungen und Staub-Effekt in der kontinuierlichen Zuckerkurve geltend machen.

Auf diese Weise kann man dann Einblicke in das Verhältnis zwischen der betreffenden Substanz und dem Zuckerassimilationsvorgang gewinnen.

Die Zuckerkurve bei Belastung mit anderen Zuckerarten als Glukose muss daher Klarheit, nicht nur über die Beziehungen des betreffenden Zuckers zum Assimilationsprozess bringen, sondern auch über die biologischen Eigenschaften der einzelnen Zuckerarten.

Deshalb habe ich mich in vorliegender Arbeit damit beschäftigt, die Beziehungen von reduktionsfähigen Zuckerarten (Fruktose, Mannose, Galaktose, Laktose, Maltose) zu Hypoglykämie und Staub-Effekt nach den Belastungen zu erforschen. Obwohl, wie allgemein bekannt, alle obengenannten Zuckerarten Reduktionsvermögen besitzen, weisen Glukose, Fruktose und Mannose doch eine besonders nahe verwandte chemische Struktur auf; und zwar sind die 3, 4, und 5 asymmetrischen Kohlenstoffketten genau dieselben, und bei diesen drei Zuckerarten erfolgt in Vitro leicht eine innere Umwandlung.

Dagegen hat Galaktose eine eigenartige Struktur und lässt sich auch in bezug auf fermentative Wirkung von den anderen unterscheiden. Ferner haben Takeda und seine Mitarbeiter (1924) klargestellt, dass Galaktose bezüglich der antiinsulinhypoglykämischen Wirkung eine gewisse Besonderheit aufweist. Daraus ist zu ersehen, dass Galaktose im Vergleich mit den übrigen Zuckerarten in bezug auf die biologischen Eigenschaften eine Sonderstelle einnimmt.

Da sich Laktose in Glukose und Galaktose spaltet und Maltose in zwei Moleküle von Glukose, müssten diese beiden Zuckerarten der Insulinhypoglykämie entgegenwirken, wenn sie im Organismus vollkommen gespalten werden. Aber entgegen der theoretischen

Erwartung besitzt nur die Maltose die antihypoglykämische Wirkung. Womit hängt dies zusammen? Nach Takeda (1924), soll dies davon abhängen, ob der betreffende Zucker im Körper vollkommen gespalten wird oder nicht, und nicht von der chemischen Struktur.

Nichts sicheres ist bis jetzt bekannt in bezug auf den Unterschied der biologischen Eigenschaften der Galaktose und der anderen drei Hexosen ausser ihrem Verhalten in der fermentativen Wirkung und der Insulinhypoglykämie. Unklarheit herrscht auch bezüglich des Schicksals der Maltose und Laktose im Organismus.

Wenn nach Zufuhr dieser Zuckerarten (bei Versuchstieren) Hypoglykämie und positiver Staub-Effekt zu Tage treten, so kann geschlossen werden, dass der gegebene Zucker entweder dieselbe Wirkung wie Glukose besitzt oder sich im Körper in Glukose spaltet, oder eine Substanz erzeugt, die in ihrer biologischen Wirkung mit Glukose identisch ist.

Es ist infolgedessen nicht ohne Interesse, den Staub-Effekt und die Hypoglykämie nach Zugabe der obengenannten verschiedenen Zuckerarten genau zu beobachten, wobei auch über den Assimilationsvorgang der Zucker sowie deren biologische Merkmale eine gewisse Aufklärung zu erhoffen ist.

II. VERSUCHSANORDNUNGEN.

Als Versuchstiere wurden immer gesunde, ausgewachsene Kaninchen (mit einem Körpergewicht von 2.0–2.5 kg), und zwar um zufällige Ereignisse (wie z. B. Schwangerschaft usw.) auszuschalten, Männchen benützt. Sie wurden täglich mit einer bestimmten Menge von Tofu-Kasu gefüttert. Vor dem Versuch liess man sie jedesmal 24 Stunden hungern. Beim Versuch wurde das Tier nicht auf dem Fixierbrett festgebunden, sondern im Stehen gehalten, um etwaige Einflüsse von Erregung, Ligatur usw. zu vermeiden.

Die Zuckerlösung wurde mit aseptischen Massregeln intravenös (in die Ohrvenen) oder intraperitoneal injiziert. Bei gleichzeitiger Blutentnahme und Ohrveneninjektion wurde immer die andere Seite gewählt.

Die Blutzuckerbestimmung erfolgte nach der Bang'schen neuen Methode, nach Hagedorn-Jensen, sowie nach der Doi'schen Bestimmungsmethode des wahren Zuckers.

III. RESULTATE DER EXPERIMENTE.

1. Intravenöser Zuckerbelastungsversuch und alimentäre hypoglykämische Erscheinung.

Bei einer grossen Anzahl von Kaninchen wurden die oben genannten Zuckerarten (Glukose, Fruktose, Mannose, Laktose, Galaktose und Maltose) intravenös injiziert.

Die Resultate der Versuche sind in der Tabelle I. gegeben, und ausserdem wurde noch der leichteren Übersicht halber ein typisches Beispiel aus vielen Fällen als Vertreter angeführt (Fig. A und B).

Fig. (A) Blutzuckerkurve bei intravenöser Zuckereinjektion (10%, 30 cem)

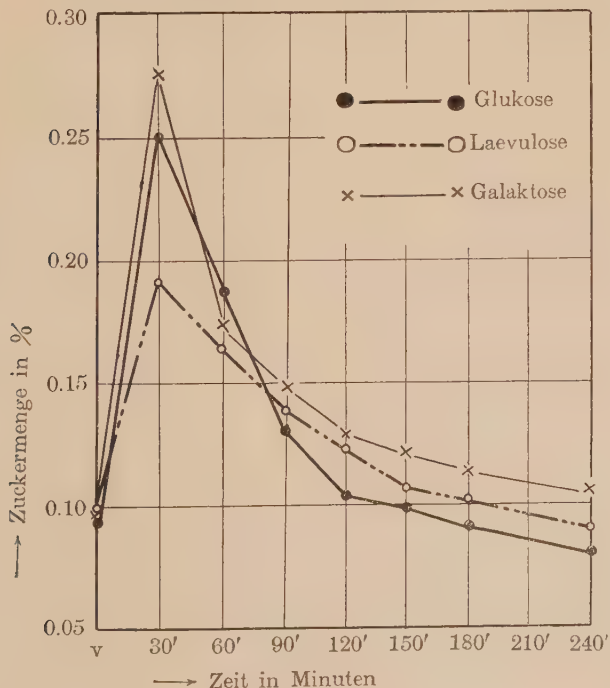
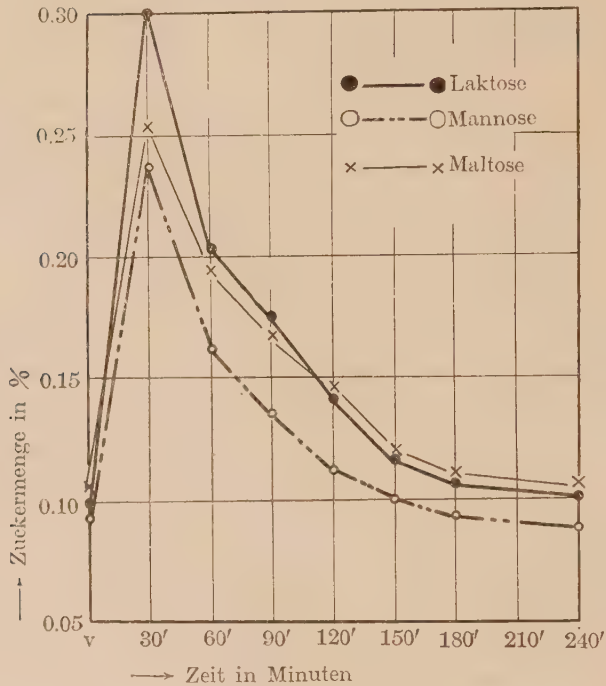


Fig. (B) Blutzuckercurve bei intravenöser
Zuckerinjektion (10%, 30 ccm)



Wie aus Fig. A zu ersehen ist, erreicht die Blutzuckercurve ihr Maximum $\frac{1}{2}$ Stunde nach Injektion¹⁾ von Glukose und Fruktose und kehrt dann allmählich abfallend nach Ablauf von $2\frac{1}{2}$ Stunden beinahe zum Wert vor dem Versuch zurück; nach 4 Stunden kommt immer Hypoglykämie vor. Bei ähnlichen Versuchen mit Galaktose dagegen war die Hypoglykämie nach 4 Stunden nicht mehr zu beobachten.

Bei intravenöser Injektion von Milchzuckerlösung (30 ccm, 10%) liess sich auch nach 4 Stunden keine Hypoglykämie mehr nachweisen. (Fig. B) Bei Maltose war die Hypoglykämie nicht so beträchtlich wie bei Glukose. Bei Mannose war dagegen die Hypoglykämie zu demselben Zeitpunkt noch nachweisbar.

1) Es wurden immer 30 ccm 10%ige Lösung des betreffenden Zuckers gegeben.

TABELLE I.

Versuch mit intravenöser Zuckerbelastung.

Datum	Nr. K.G. (kg)	Zucker- arten (cem)	Blutzucker %							
			Vor	30'	60'	90'	120'	150'	180'	240'
1930 10/X	201 (2.080)	10% 30 cem Glukose	0.095	0.252	0.185	0.129	0.103	0.100	0.091	0.085
14/X	203 (1.950)	10% 30 cem Glukose	0.088	0.265	0.195	0.145	0.098	0.085	0.079	0.075
18/X	204 (2.000)	10% 30 cem Glukose	0.100	0.282	0.201	0.158	0.110	0.103	0.102	0.095
12/X	201 (2.000)	10% 30 cem Laevulose	0.101	0.207	0.161	0.139	0.124	0.107	0.102	0.095
16/X	203 (1.900)	10% 30 cem Laevulose	0.100	0.190	0.152	0.135	0.107	0.091	0.088	0.085
20/X	204 (2.100)	10% 30 cem Laevulose	0.102	0.185	0.141	0.125	0.110	0.100	0.091	0.088
15/X	201 (2.100)	10% 30 cem Galaktose	0.099	0.257	0.213	0.160	0.138	0.135	0.125	0.121
19/X	203 (1.900)	10% 30 cem Galaktose	0.093	0.231	0.177	0.151	0.145	0.129	0.122	0.113
22/X	204 (2.150)	10% 30 cem Galaktose	0.099	0.270	0.165	0.148	0.135	0.130	0.123	0.104
25/X	209 (2.200)	10% 30 cem Laktose	0.087	0.334	0.263	0.192	0.166	0.134	0.130	0.120
2/II	212 (2.000)	10% 30 cem Laktose	0.090	0.247	0.185	0.156	0.124	0.121	0.119	0.108
4/II	215 (1.900)	10% 30 cem Laktose	0.101	0.302	0.207	0.173	0.139	0.114	0.109	0.103
28/X	209 (2.200)	10% 30 cem Mannose	0.090	0.284	0.235	0.184	0.127	0.112	0.106	0.083
5/II	212 (2.050)	10% 30 cem Mannose	0.089	0.238	0.159	0.128	0.099	0.082	0.079	0.077
7/II	215 (2.020)	10% 30 cem Maltose	0.102	0.240	0.160	0.132	0.111	0.100	0.093	0.090
30/X	209 (2.100)	10% 30 cem Maltose	0.085	0.242	0.182	0.133	0.115	0.109	0.106	0.100
8/II	212 (2.050)	10% 30 cem Maltose	0.108	0.266	0.194	0.174	0.137	0.118	0.112	0.110
10/II	215 (1.970)	10% 30 cem Maltose	0.093	0.259	0.218	0.192	0.157	0.131	0.108	0.099

2. *Das Verhalten des Wahrenzuckergehaltes im Blut bei intravenöser Zuckerbelastung.*

In den obengenannten Experimenten erzeugten Glukose, Fruktose, und Mannose die alimentäre Hypoglykämie, dagegen nicht die drei anderen Zuckerarten (Galaktose, Laktose und Maltose).

Der Blutzuckerwert in den vorangehenden Untersuchungen zeigt nur das Gesamt-Reduktionsvermögen des Blutes, welches ausser dem fermentativen wahren Zucker noch sonstige reduktionsfähige Substanzen enthält.

Nun muss festgestellt werden, ob die Hypoglykämie nach Zuckerbelastung mit der Verminderung des fermentativen wahren Zuckers zusammenhängt oder ob sie von sonstigen Restzuckerarten abhängt. Es lässt sich vermuten, dass auch bei Zufuhr der verschiedenen Zuckerarten die gegebenen Zucker 4 Stunden nach der Belastung schon aus dem Blut verschwunden sind.

Wenn man aber annimmt, dass die injizierten Zucker durch irgendwelche Gründe nach 4 Stunden nach Einverleibung noch im Blut vorhanden sind, so müsste die gesamte Zuckermenge dadurch höher geschätzt werden. Wenn dies der Fall ist, muss das gesamte Reduktionsvermögen des Blutes zugenommen haben, obgleich das Blut an Wahrenzuckergehalt abgenommen hat (gegenüber dem Gehalt vor der Belastung), was zum Ausbleiben der Hypoglykämie Erscheinung führen könnte.

Um den Zweifel zu lösen, muss man infolgedessen den Verlauf des belasteten Zuckers im Blut zeitlich genau verfolgen.

Es ist deshalb ganz klar, dass beim Vorhandensein von injiziertem Zucker im Blut die Bestimmung des gesamten Reduktionsvermögens allein keinen Aufschluss auf den eigenen Blutzuckerwert gibt, ein Punkt, den man immer im Auge behalten muss.

Die drei Zuckerarten, welche alimentäre Hypoglykämie hervorrufen, lassen sich alle leicht durch Hefe fermentieren, aber die übrigen drei Zuckerarten geraten schwer durch Hefe in Gärung. Wenn man somit von der Bestimmungsmethode des wahren Zuckers durch Hefegärung Gebrauch macht, kann man durch den zugenommenen Restzuckerwert die Menge der zugeführten Zuckermenge im Blut genau bestimmen.

Nur hat man dabei zu bedenken, dass die drei Zuckerarten (Laktose, Galaktose und Maltose) nicht absolut unfermentativ sind.

Daher muss man bei Benützung der Gärungsmethode solche Hefe auswählen, die innerhalb einer gewissen Zeit entweder nicht spaltet, oder ausserordentlich langsam spaltet.

Ich habe deshalb im Versuch die Wirkung der Hefe auf die einzelnen Zuckerarten untersucht und habe gefunden, dass die Fleischmann'sche Hefe unter verschiedenen Hefearten auf Glukose die stärkste Wirkung hatte, dagegen auf Galaktose, Laktose am schwächsten wirkte.

Im folgenden sei das Resultat des Gärungsversuchs tabellarisch zusammengefasst (s. Tab. II), bei dem der zeitliche Verlauf des Reduktionsvorgangs im Gemisch von Blutproben mit einzelnen Zuckerarten und der Fleischmann'schen Hefe untersucht wurde.

Bei diesem Versuch wurde der Reduktionswert nach der Doischen Methode bestimmt. Die einzelnen Zuckerarten wurden

TABELLE II.

Wirkung von Hefe (Fleischmann) auf verschiedene Zuckerarten.
(bei 28°)

Gärungs- zeit	Glukose (0.1%) Blut Hefe (3 Ösen)	Galaktose (0.1%) Blut Hefe (3 Ösen)	Laktose (0.1%) Blut Hefe (3 Ösen)	(Kontrolle) Wasser Blut Hefe (3 Ösen)
Vor dem Versuch	256 mg%	149 mg%	239 mg%	130 mg%
1 St.	200	207	227	108
2	120	185	199	82
3	109	156	190	66
4	92	150	149	58
5	49	137	135	45

Gärungs- zeit	Glukose (0.08%) Blut Hefe (3 Ösen)	Galaktose (0.08%) Blut Hefe (3 Ösen)	Laktose (0.08%) Blut Hefe (3 Ösen)	Laevulose (0.08%) Blut Hefe (3 Ösen)	Mannose (0.08%) Blut Hefe (3 Ösen)	Maltose (0.08%) Blut Hefe (3 Ösen)	(Kontrolle) Wasser Blut Hefe (3 Ösen)
Vor dem Versuch	215 mg%	208 mg%	200 mg%	219 mg%	220 mg%	202 mg%	135 mg%
2 St.	133	186	183	154	170	153	107
3	100	163	169	107	119	119	76
4	73	136	157	87	98	115	56
5	61	129	141	76	84	110	55
7	50	119	120	60	71	106	50

Gärungs- zeit	Glukose (0.05%) Blut Hefe (2 Ösen)	Galaktose (0.05%) Blut Hefe (1 Öse)	Laktose (0.05%) Blut Hefe (1 Öse)	(Kontrolle) Wasser Blut Hefe (1 Öse)
Vor	193 mg%	183 mg%	182 mg%	128 mg%
1 St.	165	168	170	105
2	130	136	138	80
3	80	119	119	61
4	52	95	97	53
5	48	93	94	50

Gärungs- zeit	Glukose (0.01%) Blut Hefe (2 Ösen)	Galaktose (0.01%) Blut Hefe (1 Öse)	Laktose (0.01%) Blut Hefe (1 Öse)	(Kontrolle) (Blut + Hefe (1 Öse)
Vor	160 mg%	154 mg%	151 mg%	134 mg%
1 St.	148	150	141	102
2	120	132	115	78
3	93	108	88	60
4	74	83	72	57
5	49	63	65	53

in verschiedener Konzentration (0.1–0.01%) bei Enteiweissung zugesetzt.

Nach meiner Untersuchung war Fleischmann'sche Hefe gegenüber der Glukose und Fruktose in vitro am wirksamsten, indem sie in 5 Stunden die Gärung vollendete. Die Wirkung auf Mannose war nicht so stark wie die auf die beiden erwähnten Zuckerarten, indem die Gärung in 5 Stunden nur beinahe vollkommen war. Laktose und Galaktose lassen sich am wenigsten beeinflussen; bei diesen verringerte sich der Reduktionswert des Blutgemisches nur ausserordentlich langsam, und wenn man den dem Blut eigenen Reduktionswert in Betracht zieht, muss man folgern, dass ihre Wirkung nur ganz gering ist. Die Wirkung auf Maltose war nicht so unbedeutend wie die auf Laktose und Galaktose; eine schwache Gärung liess sich sicher erkennen.

Um die Frage zu lösen, ob die alimentäre Hypoglykämie auf der Verminderung des echten Blutzuckers beruht, und wie sich die Zuckerarten im Blut verhalten, die nach intravenöser Injektion

die alimentäre Hypoglykämie vermissen lassen, habe ich 4 Stunden nach intravenöser Injektion von Glukose, Fruktose, Galaktose, Laktose, Mannose und Maltose das gesamte Reduktionsvermögen des Blutes, den Restzucker und den wahren Zucker im Blut bestimmt.

Der Gehalt des wahren Zuckers (d.h. die Gärungszuckermenge) vor und nach Zuckerbelastung (Glukose, Fruktose, Galaktose, Laktose und Mannose) sind in der Tabelle III gegeben.

Wie aus der Tabelle ersichtlich ist, war das gesamte Reduktionsvermögen des Blutes 4 Stunden nach der Zuckerzufuhr (Glukose, Fruktose, Mannose) geringer als vor der Injektion. Die Menge des wahren Zuckers zeigt auch eine mehr oder weniger deutliche Verringerung. Daraus kann man schliessen, dass die Hypoglykämie nach Zuckerbelastung (Glukose, Fruktose, Mannose) auf der Verminderung der Gehalt des wahren Zuckers des Blutes beruht. Das gesamte Reduktionsvermögen des Blutes 4 Stunden nach Injektion von Laktose wurde im Vergleich zu dem vor der Belastung nicht nur nicht herabgesetzt, sondern vielmehr ein wenig erhöht gefunden.

Gleich nach Zufuhr von Galaktose und Laktose erhöhte sich der Restzuckerwert, um dann allmählich abzufallen und 4 Stunden danach zur Norm zurückzukommen; mit anderen Worten waren diese Zuckerarten aus dem Blut in 4 Stunden nach der Belastung verschwunden. Bei beiden Zuckerarten vermehrte sich der Gehalt des wahren Zuckers fast regelmässig $\frac{1}{2}$ –1 Stunde nach Einverleibung, verringerte sich dann allmählich, erreichte aber 4 Stunden nach Injektion einen Wert, der ein wenig über dem Anfangsniveau lag. Dass bei Galaktose und Milchzucker keine hypoglykämische Erscheinung auftrat, beruht nicht auf der Verzögerung des Verschwindens des Zuckers aus dem Blut, sondern auf dem Ausbleiben der Verminderung des wahren Zuckers im Blut. Bei Maltose war das Resultat ähnlich wie bei Laktose oder Galaktose, aber bei Hefeproben liess sich eine leichte Gärung erkennen; daher kann man aus dem vorliegenden Versuch nicht sicher erkennen, ob nicht ein Bruchteil von Maltose 4 Stunden nach der Zuckerbelastung noch im Blut zurückgeblieben ist.

TABELLE III.

Die einzelnen Zuckerwerte nach der intravenösen Zuckerbelastung
mit verschiedenen Zuckerarten.

Nummer (Körper- gewicht) kg	Zucker- arten:	Belastete Zucker- menge: (10%) ccm	Einzelner Zuckerwert:	Zuckerwert: (mg %)					
				Vor	30'	60'	120'	180'	240'
Nr. 259 (2.000)	Glukose	20	Gesamt- reduktion	126	229	137	130	128	120
			Restzucker	30	37	26	30	30	37
			Wahrer Zucker	96	192	111	100	98	83
256 (2.150)	Glukose	20	G. R.	121	238	151	134	120	114
			R. Z.	29	39	35	39	40	34
			W. Z.	92	199	116	95	80	80
257 (2.070)	Laevulose	20	G. R.	135	212	163	150	143	130
			R. Z.	37	37	40	38	38	37
			W. Z.	98	175	123	112	105	93
260 (2.300)	Laevulose	20	G. R.	135	245	186	154	150	129
			R. Z.	42	42	45	44	40	41
			W. Z.	93	203	141	110	110	88
261 (2.000)	Mannose	20	G. R.	133	214	159	135	132	124
			R. Z.	45	70	64	62	60	44
			W. Z.	88	144	95	73	72	80
263 (2.450)	Mannose	20	G. R.	138	219	165	147	138	132
			R. Z.	48	70	61	48	60	50
			W. Z.	90	149	104	99	78	82
249 (2.000)	Galaktose	20	G. R.	125	205	183	153	145	125
			R. Z.	45	115	93	61	55	43
			W. Z.	80	90	90	92	90	82
248 (2.100)	Galaktose	20	G. R.	126	201	190	172	165	139
			R. Z.	48	103	95	82	78	55
			W. Z.	78	98	95	90	87	84
250 (2.200)	Laktose	20	G. R.	127	194	173	131	130	128
			R. Z.	43	108	89	41	41	39
			W. Z.	84	86	84	90	89	89
255 (2.050)	Laktose	20	G. R.	138	257	194	161	146	141
			R. Z.	48	141	87	67	55	50
			W. Z.	90	116	107	94	91	91
252 (2.300)	Maltose	20	G. R.	132	248	189	180	160	141
			R. Z.	47	124	69	57	49	45
			W. Z.	85	124	120	123	111	96
251 (2.000)	Maltose	20	G. R.	120	196	145	134	124	121
			R. Z.	52	120	60	55	47	44
			W. Z.	68	76	85	79	77	77

3. Intravenöse Doppelbelastung mit verschiedenen Zuckerarten.

Ich habe nun untersucht, wie sich der Staub-Effekt nach intravenöser Doppelbelastung mit den oben genannten 6 Zuckerarten verhält.

Es wurden immer 30 cem 10%iger Zuckerlösung intravenös eingespritzt. Die zweite Injektion erfolgte 2 Stunden nach der ersten. Die Zuckerwerte wurden im Intervall von $\frac{1}{2}$ Stunde gemessen. Das Resultat ist das folgende: Lävulose und Glukose: Die Zuckerkurve erreichte sowohl bei der ersten wie bei der zweiten Injektion $\frac{1}{2}$ Stunde nach Zufuhr ihren Gipfelpunkt, aber der zweite Gipfel war niedriger als der erste, d. h. der Staub-Effekt war in diesem Fall positiv (Fig. C). Bei Galaktose war der erste Höhe-

Fig. (C) Blutzuckercurve bei intravenöser Doppelbelastung.

Es wurden 30 cem 10% iger Zuckerlösung im Intervall von 2 Stunden 2 mal eingespritzt.

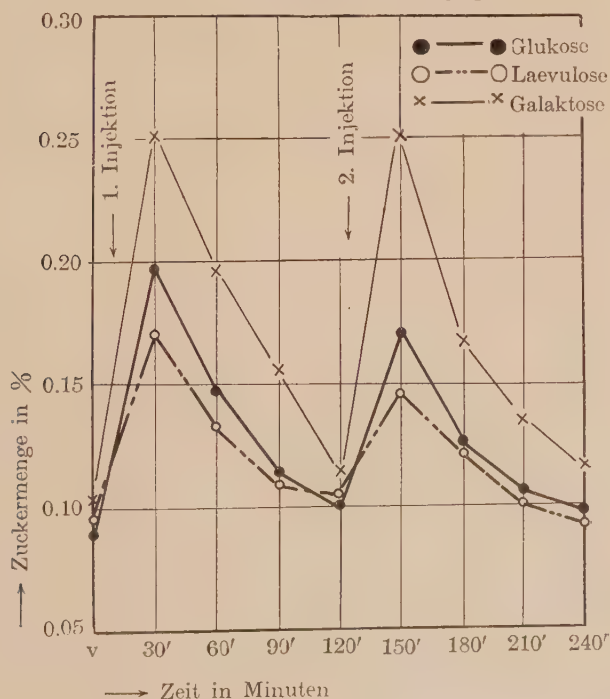
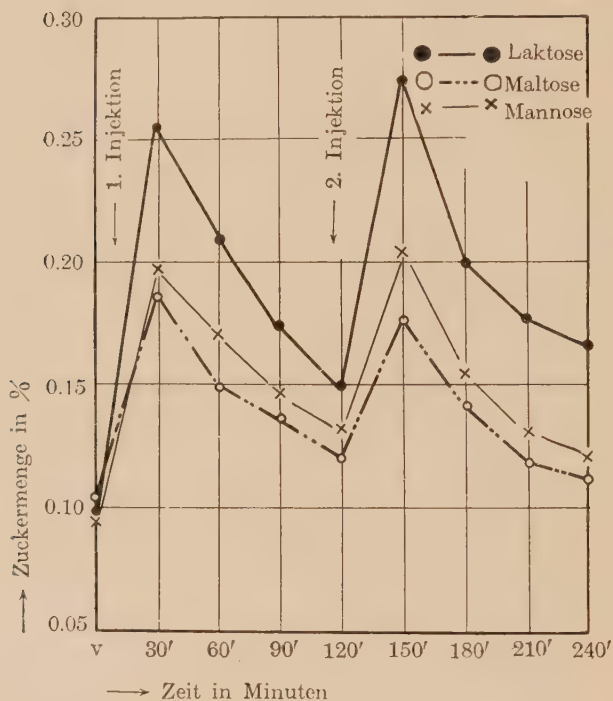


Fig. (D) Blutzuckercurve bei intravenöser Doppelbelastung.
Es wurden 30 cem 10% iger Zuckerlösung im
Intervall von 2 Stunden 2 mal eingespritzt.



punkt dagegen niedriger als der zweite, wir haben es nämlich mit dem negativen Staub-Effekt zu tun. Bei Laktose und Maltose war wie bei Galaktose der zweite Gipfel höher als der erste (negativer Staub-Effekt), dagegen war bei Mannose der zweite Gipfel niedriger als der erste (positiver Staub-Effekt) (Tabelle IV). Zusammenfassend kann man sagen: bei Glukose, Lävulose, Mannose, die im einmaligen Belastungsversuch hypoglykämische Erscheinung hervorriefen, liess sich beim Doppelbelastungsversuch positiven Staub-Effekt nachweisen. Dagegen war der Staub-Effekt negativ bei solchen Zuckerarten wie Laktose, Galaktose und Maltose, die nach einmaliger Belastung die hypoglykämische Erscheinung vermissen liessen.

TABELLE IV.
Blutzuckerwert bei intravenöser Doppelbelastung.
(Die Pfeile ← bedeuten den Zeitpunkt der Zuckerzufuhr).

Datum	Nr. K.G. (kg)	Zucker- arten	Blutzucker %								
			Vor →	30'	60'	90'	120' →	150'	180'	210'	240'
1931	219	10% 30 ccm									
10/I	(2.150)	Glukose	0.088	0.192	0.120	0.090	0.079	0.155	0.104	0.100	0.090
7/I	217										
	(2.250)	„	0.099	0.243	0.167	0.139	0.090	0.220	0.165	0.107	0.097
20/I	221										
	(2.000)	„	0.091	0.264	0.146	0.102	0.083	0.230	0.141	0.100	0.089
25/III	231										
	(2.000)	„	0.113	0.248	0.185	0.120	0.110	0.229	0.138	0.119	0.100
13/I	219	10% 30 ccm									
	(2.000)	Laevulose	0.090	0.179	0.134	0.115	0.109	0.138	0.113	0.098	0.098
9/I	217										
	(2.150)	„	0.096	0.151	0.118	0.109	0.101	0.132	0.128	0.115	0.095
23/I	221										
	(2.070)	„	0.103	0.162	0.120	0.110	0.099	0.158	0.118	0.083	0.078
28/III	231										
	(2.100)	„	0.094	0.153	0.128	0.113	0.089	0.142	0.105	0.099	0.080
16/I	219	10% 30 ccm									
	(1.950)	Galaktose	0.101	0.242	0.194	0.155	0.109	0.259	0.165	0.134	0.128
12/I	217										
	(2.200)	„	0.110	0.248	0.229	0.165	0.133	0.288	0.189	0.173	0.143
26/I	221										
	(2.100)	„	0.097	0.194	0.160	0.136	0.119	0.216	0.178	0.135	0.121
31/III	231										
	(2.000)	„	0.098	0.297	0.194	0.166	0.139	0.291	0.229	0.178	0.142
15/II	225	10% 30 ccm									
	(2.000)	Laktose	0.100	0.256	0.207	0.173	0.155	0.278	0.195	0.190	0.172
21/II	227										
	(1.970)	„	0.111	0.280	0.203	0.188	0.167	0.328	0.247	0.191	0.170
2/III	229										
	(2.100)	„	0.112	0.218	0.213	0.166	0.140	0.231	0.199	0.153	0.134
13/III	230										
	(1.880)	„	0.097	0.225	0.168	0.158	0.136	0.222	0.182	0.152	0.121
18/II	225	10% 30 ccm									
	(1.810)	Mannose	0.105	0.187	0.150	0.134	0.121	0.180	0.142	0.122	0.120
24/II	227										
	(2.000)	„	0.097	0.201	0.154	0.126	0.110	0.198	0.145	0.125	0.120
5/III	229										
	(1.950)	„	0.095	0.234	0.183	0.137	0.108	0.220	0.170	0.140	0.120
16/III	230										
	(1.970)	„	0.089	0.190	0.145	0.124	0.115	0.180	0.154	0.120	0.119
21/II	225	10% 30 ccm									
	(2.000)	Maltose	0.107	0.199	0.171	0.146	0.136	0.223	0.162	0.138	0.126
27/II	227										
	(1.950)	„	0.103	0.204	0.214	0.153	0.140	0.209	0.170	0.158	0.118
8/III	229										
	(2.050)	„	0.101	0.237	0.215	0.189	0.160	0.277	0.220	0.198	0.166
19/III	230										
	(2.250)	„	0.092	0.217	0.215	0.165	0.146	0.225	0.196	0.165	0.150

4. Intraperitonealer Doppelbelastungsversuch mit verschiedenen Zuckerarten.

Um zu konstatieren, ob man auch bei intraperitonealer Doppelbelastung dasselbe Prinzip wie im vorangehenden Kapitel nachweisen kann, habe ich noch das Verhalten des Staub-Effektes mit denselben Versuchsanordnungen untersucht.

Bei Glukose und Lävulose erreichte die Zuckercurve, wie aus Fig. E ersichtlich ist, jeweils $\frac{1}{2}$ Stunde nach Injektion (10%, 30 cem) ihren Höhepunkt, aber der zweite Gipfel war niedriger als der erste, es handelt sich also um den positiven Staub-Effekt. Bei Galaktose wies die zweite Zuckercurve einen höheren Gipfel als die erste auf (negativer Staub-Effekt). Bei Laktose und

Fig. (E) Blutzuckercurve bei intraperitonealer Doppelbelastung.
Es wurden 30 cem 10% iger Zuckerlösung im
Intervall von 2 Stunden 2 mal eingespritzt.

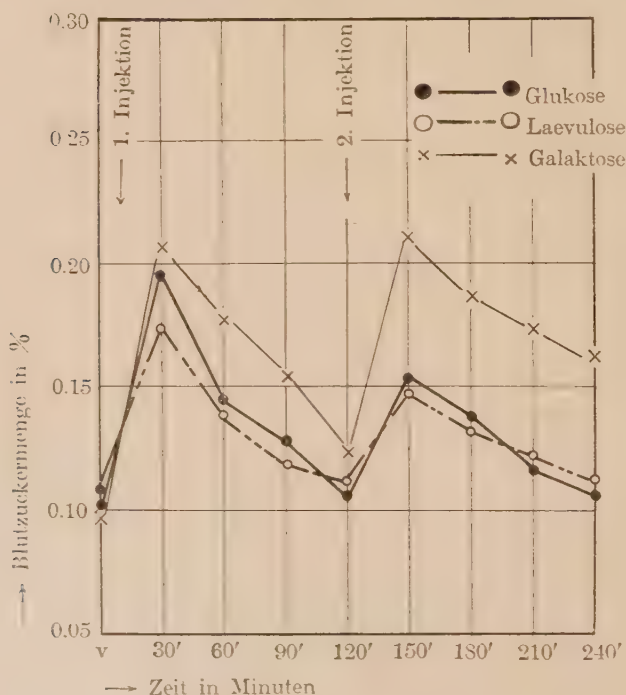
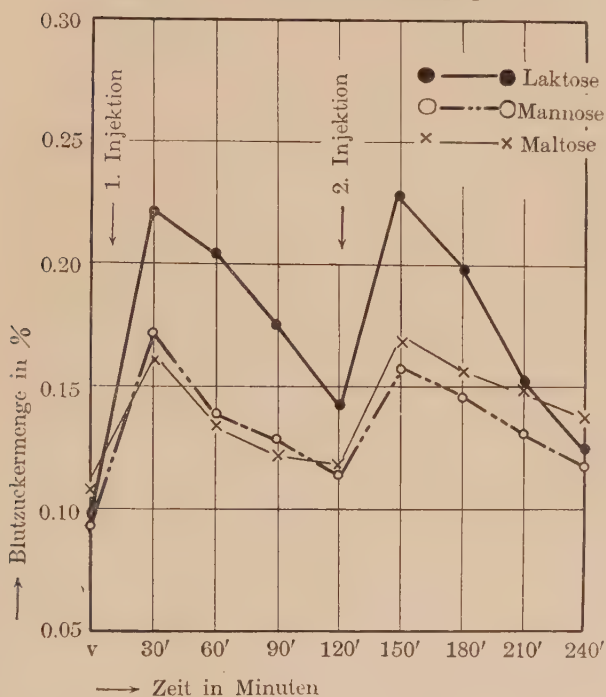


Fig. (F) Blutzuckerkurve bei intraperitonealer Doppelbelastung.
Es wurden 30 cem 10% iger Zuckerlösung im
Intervall von 2 Stunden 2 mal eingespritzt.



Maltose war, wie Fig. F zeigt, der Gipfel der zweiten Kurve höher als der der ersten (negativer Staub-Effekt). Bei Mannose war dagegen der zweite Gipfel niedriger als der erste (positiver Staub-Effekt). (Tabelle V).

Zusammenfassend lässt sich sagen: der Staub-Effekt war, wie bei der intravenösen Doppelbelastung, bei Laktose, Galaktose und Maltose negativ. Hierbei ist nur zu beachten, dass der Staub-Effekt im allgemeinen bei intraperitonealer Injektion viel deutlicher war als bei intravenöser Belastung.

IV. ZUSAMMENFASSUNG.

1. Bei einmaliger intravenöser Injektion erzeugten Glukose, Lävulose und Mannose hypoglykämische Erscheinung, welche bei

TABELLE V.

Blutzuckerwert bei intraperitonealer Doppelbelastung.
(Die Pfeile → bedeuten den Zeitpunkt der Zuckerzufuhr).

Datum	Nr. K.G. (kg)	Zucker- arten	Blutzucker %								
			Vor	30'	60'	90'	120'	150'	180'	210'	240'
1931	233	10% 30 cem									
25/III	(2.000)	Glukose	0.105	0.182	0.147	0.130	0.121	0.151	0.140	0.118	0.110
2/IV	236										
	(1.900)	„	0.099	0.242	0.167	0.139	0.103	0.200	0.165	0.107	0.099
6/IV	238										
	(2.400)	„	0.110	0.203	0.190	0.163	0.135	0.153	0.125	0.120	0.116
10/IV	239										
	(2.050)	„	0.105	0.189	0.161	0.130	0.109	0.145	0.130	0.112	0.110
28/III	233	10% 30 cem									
	(2.000)	Laevulose	0.108	0.183	0.155	0.134	0.116	0.147	0.133	0.124	0.115
5/IV	236										
	(2.000)	„	0.120	0.173	0.159	0.124	0.102	0.136	0.130	0.127	0.118
9/IV	238										
	(2.350)	„	0.110	0.186	0.175	0.151	0.135	0.147	0.140	0.130	0.113
13/IV	239										
	(2.090)	„	0.102	0.172	0.160	0.151	0.122	0.161	0.137	0.131	0.120
31/III	233	10% 30 cem									
	(2.030)	Galaktose	0.089	0.176	0.157	0.140	0.120	0.207	0.220	0.190	0.150
8/IV	236										
	(2.100)	„	0.081	0.189	0.178	0.154	0.148	0.198	0.199	0.190	0.170
12/IV	238										
	(2.330)	„	0.103	0.212	0.230	0.195	0.160	0.221	0.243	0.190	0.137
16/IV	239										
	(2.120)	„	0.110	0.19	0.181	0.152	0.150	0.222	0.210	0.200	0.185
25/IV	244	10% 30 cem									
	(2.330)	Laktose	0.100	0.215	0.238	0.190	0.161	0.230	0.219	0.169	0.160
26/IV	245										
	(2.000)	„	0.101	0.188	0.191	0.172	0.151	0.169	0.197	0.189	0.155
5/V	247										
	(1.890)	„	0.112	0.218	0.213	0.166	0.140	0.231	0.199	0.133	0.100
9/V	249										
	(2.500)	„	0.110	0.210	0.216	0.200	0.191	0.218	0.220	0.185	0.171
28/IV	244	10% 30 cem									
	(2.300)	Mannose	0.087	0.170	0.125	0.120	0.117	0.164	0.150	0.120	0.117
29/IV	245										
	(1.910)	„	0.101	0.165	0.135	0.130	0.112	0.161	0.152	0.131	0.120
8/V	247										
	(1.920)	„	0.125	0.168	0.180	0.155	0.150	0.165	0.159	0.141	0.121
12/V	219										
	(2.440)	„	0.115	0.180	0.144	0.128	0.120	0.175	0.158	0.150	0.109
1/V	234	10% 30 cem									
	(2.370)	Maltose	0.110	0.166	0.136	0.128	0.120	0.176	0.170	0.155	0.139
2/V	245										
	(2.000)	„	0.112	0.219	0.240	0.228	0.201	0.212	0.220	0.192	0.174
11/V	247										
	(1.950)	„	0.105	0.180	0.158	0.130	0.112	0.200	0.212	0.189	0.150
15/V	249										
	(2.400)	„	0.097	0.190	0.159	0.150	0.144	0.220	0.202	0.190	0.158

Galaktose, Maltose, Laktose fehlt.

2. Die hypoglykämische Erscheinung nach Einverleibung von Glukose, Lävulose und Mannose beruht auf der Verminderung des wahren Zuckers, was der Vergleichsversuch des gesamten Reduktionsvermögens und Restzuckers des Blutes sowie des wahren Zuckers nachgewiesen hat. Dass bei Galaktose, Laktose und Maltose die hypoglykämische Erscheinung fehlt, ist nicht auf die Verzögerung des Verschwindens der injizierten Zucker aus dem Blut, sondern auf das Ausbleiben der Verminderung des wahren Zuckers zurückzuführen.

3. Bei intravenöser Doppelbelastung ist positiver Staub-Effekt nachgewiesen bei Glukose, Lävulose und Mannose, negativer bei Laktose, Galaktose und Maltose.

Jedoch war der Effekt bei den erst genannten zwei Zuckerarten (Glukose und Lävulose) nicht so beträchtlich wie bei intraperitonealer Injektion, und bei Mannose war er weniger deutlich als bei diesen 2 Hexosen.

4. Bei intraperitonealer Doppelbelastung zeigten Glukose, Lävulose und Mannose positiven Staub-Effekt, wobei er bei dem letzteren Zucker weniger deutlich als bei den ersteren beiden war. Bei Laktose und Galaktose war der Effekt fast immer, und bei Maltose grösstenteils negativ.

5. Glukose, Lävulose und Mannose besitzen die Fähigkeit, die Zuckerassimilationsvorgänge im Organismus zu befördern, aber Galaktose und Laktose sind in dieser Hinsicht wirkungslos. Betreffs Maltose kann man nichts Sicheres sagen.

6. Nach meiner Untersuchung ist auch zu bestätigen, dass Galaktose, welcher im Vergleich mit den anderen 3 Hexosen eine charakteristische chemische Struktur zukommt, eine Sonderstelle bezüglich der biologischen Eigenschaften einnimmt.

Es ist meine angenehme Pflicht, Herrn Dr. Takeda für seine stetige Anregung und Hilfe, den Herren Professoren Kakiuchi (Universität zu Tokyo), Onodera und Kodama (Universität in Kyushu) für ihre freundlichen Ratschläge und Durchsicht der Arbeit herzlich zu danken.

LITERATUR

- Adlersberg u. Porges (1926): Klin. Wochenschr. Nr. 32, 1451.
Depisch u. Hosenöhrle (1926): Klin. Wochenschr. Nr. 43, 2011.
Depisch u. Hosenöhrle (1928): Zeitschr. f. d. gesam. exp. Med. 58, 81.
Doi (1932): J. of Bioch., 15, 427.
Hosaka (1924): Jikken-Igaku-Zasshi, Bd. 8, Nr. 11.
Koref u. Rigler (1924): Klin. Wochenschr. Nr. 34, 1538.
Lennox (1927): Journ. of biolog. chem. Vol. 73, 237.
Pollak (1923): Ergebnis. d. inn. Med. und Kinderheilk. 23.
Pollak (1927): Klin. Wochenschr. Nr. 41, 1942.
Staub (1921): Zeitschr. f. Klin. Med. 91.
Staub (1922): Zeitschr. f. Klin. Med. 93, 123.
Staub (1926): Zeitschr. f. Klin. Med. 104, 587.
Staub (1927): Klin. Wochenschr. Nr. 9, 401.
Takeda, Sugawara u. Tsunekawa (1924): Nihon-Naika-Gakkai-Zasshi Bd. 17, Nr. 10.

KEIMDRÜSENAUTOLYSE UNTER DEM EINFLUSS DER GALLENSÄURE.

VON

KEIZO TANAKA.

*(Aus dem physiologisch-chemischen Institut zu Okayama.
Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)*

(Eingegangen am 22. Oktober 1932)

Es ist schon eine bekannte Tatsache, dass die männlichen Keimdrüsen und Spermien viele Nukleine enthalten, die bei der Autolyse viele Purine und Diaminosäuren abgeben.

Neuerdings haben viele Autoren wie Karasawa (1926-27), Hatakeyama (1927), Kobayashi (1928), Sekitoo (1929) und T. Okamura (1928) experimentell bereits nachgewiesen, dass die Zufuhr von Gallensäure, sowohl bei Tierversuchen als auch bei der Organautolyse, den Nukleinstoffwechsel fördernd beeinflusst, und dass die Gallensäure die Nuklease der Leber und des Darms fördert. Ich (1930) habe schon berichtet, dass bei parenteraler Zufuhr von Cholsäure im Harn des Kaninchens Diaminosäuren bzw. Arginin und Purinbasen bzw. Xanthin ausgeschieden werden. Auf Grund der oben angeführten Resultate kommt man zu der Ansicht, dass die Gallensäure die Wirkung der Purinoxidase fördert. Die vermehrte Ausscheidung des Allantoins im Harn von stauungsikterischen Kaninchen ist ein Beweis dafür, wie von Hatakeyama (l.c.) dargetan wurde. Früher hat Karasawa (l.c.) bei Autolyse von Stier- und Schweinehoden unter Zusatz von Gallensäure in einem Falle den Diaminosäurestickstoff vermehrt gefunden. Auch hat Ikoma (1928) bei Muskelaulyse unter Einfluss von Gallensäure die Vermehrung des Arginins beobachtet, was Argininausscheidung im Harne zur Folge gehabt haben dürfte. Die Ausscheidung des Arginins im Kaninchenharn bei Zufuhr von Gallensäure ist wohl auf die gesteigerte Nukleinspaltung zurückzuführen, weil die Wirkung der Arginase, die nach Mihara (1911) im Stierhoden vorkommt, nach Hatakeyama (1929-30) durch Cholsäure gehemmt wird.

Um diese Frage klar zu stellen, habe ich Purinbasen und Diaminosäuren unter Einfluss der Cholsäure im Hodenautolysat untersucht, weil der Hoden bekanntlich an Nuklein reich ist. Es ist besonders interessant, die Hodenautolyse unter dem Einfluss der Gallensäure zu erforschen, weil nach Butenandt (1931) im Harn der Schwangeren ein Sterin, Pregnandiol, vorkommt, das als ein Abbauprodukt der Gallensäure zu betrachten ist.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

Der möglichst aseptisch bereitete und äusserst fein zerriebene frische Stierhodenbrei wurde in 2 Portionen getrennt, von denen die eine als Kontrolle benutzt, und die andere unter Zusatz von Cholsäure (0.5% des gesamten Autolysats) der Autolyse unterworfen wurde. Dann wurden die beiden Portionen je mit der doppelten Menge Wasser versetzt und unter Zusatz von Chloroform und Toluol in einer gut verschlossenen Flasche bei 37°C 2–8 Tage stehen gelassen. Das Autolysat wurde aufgekocht und koliert. Der Rückstand wurde 3mal mit Wasser extrahiert. Das mit diesem Wasser vereinigte Kolat wurde in üblicher Weise durch Tannin von Eiweiss befreit und im Vakuum eingeeengt. Dabei wurde zuerst ein büschelförmiger Nadelkrystall ausgeschieden, der als Tyrosin erwiesen wurde.

Analyse:

0.2028 g Substanz verbrauchten bei Kjeldahl 11.19 ccm n/10H₂SO₄

C ₉ H ₁₁ O ₃ N	Ber. 7.73%N
	Gef. 7.72 „

Seine salzsaure Lösung drehte das polarisierte Licht nach links.
Tyrosingehalt: Aus 11.59 kg Stierhoden (8 Tage Autolyse)

1) Kontrolle	2.3264 g
2) Bei Zusatz von Cholsäure	1.9482 g

Dieses Tyrosin wird hauptsächlich durch die Wirkung der Autoproteasen befreit. In 3 kg ganz frischem Stierhoden wurde kein Tyrosin nachgewiesen. Dieses Ergebnis zeigt, dass die Stierhodenautolyse durch Cholsäure hemmend beeinflusst wird, wie von

Karasawa bewiesen wurde.

Die vom Tyrosin abfiltrierte Flüssigkeit wurde weiter im Vakuum eingengt und in 5%iger schwefelsaurer Lösung mit 20%iger Phosphorwolframsäurelösung ausgefällt. Die Fällung wird als Basenfraktion, und das Filtrat davon als Aminosäurenfraktion bezeichnet.

I. DER EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE PURINBASEN-SPALTUNG IM HODENAUTOLYSAT.

Purinbasen.

Die Phosphorwolframsäurefällung wurde durch Baryt zerlegt. Aus der von Baryt befreiten Lösung wurden die Purinbasen in üblicher Weise mit Silbernitratlösung gefällt und in ihre Bestandteile getrennt.

a) Aus 54.18 kg Stierhoden wurde 0.039 g Guanin erhalten.

Analyse:

0.039 g Substanz verbrauchten bei Kjeldahl 12.9 ccm n/10 H₂SO₄

C ₅ H ₅ N ₅ O	Ber. 46.36%N
	Gef. 46.31 „

b) *Xanthin*

Analyse:

0.031 g Substanz verbrauchten bei Kjeldahl 8.15 ccm n/10 H₂SO₄

C ₅ H ₄ N ₄ O ₂	Ber. 36.85%N
	Gef. 36.81 „

c) *Adeninpikrat*

Es bräunt bei 240°C und zersetzt sich bei 280–281°C.

d) *Hypoxanthinpikrat*

Es bräunt bei 200°C und zersetzt sich bei 258–260°C.

Leichten Verständnisses halber habe ich die Ergebnisse in folgende Tabelle zusammengefasst:

TABELLE I.
15.5 kg Stierhoden, 2 Tage Autolyse.

Purinbasen	Versuch 1	Kontrolle	Bei 0.5% Cholsäuregehalt
Guanin		0.015 g	0.029 g
Adeninpikrat		0.221	0.291
Hypoxanthinpikrat		0.094	0.109
Xanthin		0.043	0.058

TABELLE II.
11.59 kg, 8 Tage Autolyse.

Purinbasen	Versuch 2	Kontrolle	Bei 0.5% Cholsäuregehalt
Guanin		0.010 g	0.012 g
Adeninpikrat		0.102	0.120
Hypoxanthinpikrat		0.150	0.172
Xanthin		0.051	0.082

Aus der Tabelle ergibt sich, dass im Hodenautolysat Adenin, Guanin, Hypoxanthin und Xanthin nachgewiesen werden, wie Kotake (1904) und Morinaka (1923) gezeigt haben. Was die Mengenverhältnisse der Purinbasen betrifft, so wird in der Tabelle gezeigt, dass das Adenin und Guanin im Laufe der Autolysenzeit sich vermindern, während das Hypoxanthin und Xanthin dagegen vermehrt werden. Das scheint mir darauf zu beruhen, dass bei langer Autolyse der Desaminierungsvorgang fortschreitet. Bei Zufuhr von Cholsäure werden im allgemeinen alle Purinbasen bei 2- sowie 8 tägiger Autolyse vermehrt. Weiter ist daraus ersichtlich, dass in kurzer Autolyse Adenin und Guanin, in langer aber Hypoxanthin und Xanthin vermehrt werden. Durch dieses Experiment wird bewiesen, dass die Nukleinsäurespaltung bzw. die Desaminierung der Purinbasen durch Cholsäure gefördert wird, indem höchstwahrscheinlich die Cholsäure die Nuklease und Desamidase im Hoden fördernd beeinflusst.

II. DER EINFLUSS DER CHOLSÄURE AUF DIE DIAMINOSÄUREN- SPALTUNG IM HODENAUTOLYSAT.

Diaminosäuren.

Die von Purinbasen befreite Lösung wurde in üblicher Weise mit Silber und Baryt gefällt, und die Fällung von Silber und Baryt befreit. Die im Vakuum auf etwa 200 ccm eingeeengte Lösung wurde wieder mit Sublimat und Kohlensäure gefällt. Die aus der Fällung von Quecksilber befreite Lösung wurde nach Kossel und Kutscher (1900/01) nochmals mit Sublimat und Baryt völlig gefällt. Diese Fällung muss Histidin enthalten. Aus der von Quecksilber und Baryt befreiten Lösung wurde das Histidin als Pikrolonat isoliert, das bei 232°C schmilzt. Aus der von Histidin befreiten Lösung wurde nach Kossel und Gross (1924) das Arginin als Flavianat gefällt, das bei 258–260°C schmilzt.

Analyse:

4.749 mg Substanz ergaben 6.875 mg CO₂ und 1.790 mg H₂O

C₁₀H₆O₈N₂S.C₆H₁₄O₂N₄ Ber. C 39.32% H 4.12%

Ger. 39.50 „ 4.22 „

Aus der durch Silber und Baryt von Arginin und Histidin befreiten Lösung wurde das Lysin wieder als Phosphorwolframat gefällt, und aus dieser Fällung das Lysin als Pikrat isoliert, das bei 253°C schmilzt.

15.59 kg Stierhoden, 2 Tage Autolyse.

Versuch 3 Hexonbasen	Kontrolle	Bei 0,5% Cholsäuregehalt
Histidinpikrolonat	0.045 g	0.058 g
Argininflavianat	0.047	0.068
Lysinpikrat	0.098	0.102

Aus der Tabelle ist ersichtlich, dass die Hexonbasen bzw. das Arginin im Hodenautolysat durch Zusatz von Cholsäure vermehrt

werden. Dies scheint mir darauf zu beruhen, dass die Spaltung der Eiweisskomponenten des Nukleins, d. h. Protamin und Histone, durch Cholsäure gefördert wird, indem dadurch die Hexonbasen bzw. das Arginin im Hodenautolysat vermehrt werden. Durch Cholsäure scheint also die Wirkung der Protaminase nach Waldschmidt-Leitz(1931) gefördert zu werden. Wenn ein Rückfluss der Galle bzw. der Gallensäure in die nukleinreichen Organe und Gewebe stattfindet, wie nämlich beim Stauungsikterus, so wird also hier die Spaltung der Nukleine gesteigert, und ihr Spaltungsprodukt, z. B. das Arginin, im Exkrete vermehrt, wie auch das Arginin durch Zufuhr von Cholsäure im Kaninchenharn von Tanaka und Yata (l. c.) vermehrt gefunden wurde.

ZUSAMMENFASSUNG.

Bei der Stierhodenaulyse werden im allgemeinen durch Zusatz von Cholsäure die Purinbasen bzw. Xanthin und Diaminosäuren bzw. Arginin vermehrt, infolge der Wirkung der Cholsäure, die den Nukleinstoffwechsel fördert.

LITERATUR.

- Butenandt, A. (1931): Chem. Ber., **64**, 2529.
Hatakeyama, T. (1927): Jl. of Bioch., **7**, 145.
Hatakeyama, T. (1929/30): Arb. d. Med. Univ. Okayama, **1**, 383.
Ikoma, S. (1928): Okayama Igakkai-Zasshi, **40** Jg. 890.
Karasawa, R. (1926): Jl. of Bioch. **6**, 139.
Kobayashi, T. (1928): Jl. of Bioch., **9**, 251.
Kotake, Y. (1904): Zs. f. physiol. Chem., **43**, 105.
Kossel, A. und Kutcher, F. (1900/01): Zs. f. physiol. Chem., **31**, 165.
Kossel, A. und Gross, R. E. (1924) Zs. f. physiol. Chem., **135**, 167.
Mihara, S. (1911): Zs. f. physiol. Chem., **75**, 443.
Morinaka, K. (1923): Zs. f. physiol. Chem., **124**, 259.
Okamura, T. (1928): Jl. of Bioch., **8**, 391.
Sekitoo, T. (1929): Jl. of Bioch., **11**, 251.
Tanaka, K. und Yata, S. (1930): Arb. d. Med. Univ. Okayama, **2**, 304.
Waldschmidt-Leitz, E., Ziegler, F., Schöffner, A. und Weil, L. (1931): Zs. f. physiol. Chem., **197**, 219.

UNTERSUCHUNGEN ÜBER DIE BLUTGERINNUNG.

I. Mitteilung.

Über die aus der Niere erhaltene blutgerinnungshemmende Substanz.

VON

OSAMU KASHIWAMURA.

(Aus dem Biochem. Institut der Mediz. Akademie zu Kumamoto.
Vorstand: Prof. S. Kato.)

(Eingegangen am 29. Oktober 1932)

EINLEITUNG.

Howell und Holt (1918) hatten aus der Hundeleber eine wasserlösliche, durch Azeton niederschlagbare blutgerinnungshemmende Substanz ausgezogen und sie Heparin benannt. Der Verfasser und Katsuki (1927) haben unter der Vermutung, dass diese Substanz nicht nur in der Leber, sondern auch in anderen Organen verbreitet sein muss, nach der Howell'schen Methode sie aus Milz, Niere, Lunge u. a. m. mit Erfolg extrahiert und klargestellt, dass die aus der Niere erhaltene Substanz die stärkste Wirkung zeigt.

Danach modifizierte ich die Howell'sche Methode und gewann durch diese meine Methode aus der Pferdeniere die blutgerinnungshemmende Substanz. Diese Substanz habe ich von verschiedenen Seiten aus geprüft und dadurch einige neue Erkenntnisse gewonnen.

I. BLUTKOAGULATION UND MEINE BLUTGERINNUNGHEMMENDE SUBSTANZ, NUCLEOPROTEID, NUCLEINSÄURE.

Kurze Beschreibung der von mir modifizierten Methode.*

Das durch Ventilation oder durch Entwässerung mit Aceton getrocknete Nierenpulver wird mit dem 6fachen Volum 1%iger

* Siehe die ausführliche Mitteilung in Berichte d. biochem. Instituts d. med. Akademie zu Kumamoto, Vol. II. (1932).

Kochsalzlösung 20 Minuten lang extrahiert, während welcher Zeit durch Zusatz von Ammoniakwasser das Ganze alkalisch erhalten wird. Zwanzig Minuten danach packt man diesen Organbrei in feinmaschigen Schirting ein, das Ganze aufs neue in Leinwand, und presst es dann mittels einer Pressmaschine aus. Der erhaltene Presssaft braucht nicht zentrifugiert zu werden, sondern wird langsam mit verdünnter Salzsäure versetzt, der entstandene Niederschlag filtriert und in 95%igem Methylalkohol gekocht, dann pulverisiert und, schwach alkalisch erhalten, mit Wasser 30 Minuten lang extrahiert. Die oben stehende klare Flüssigkeit wird durch die Zentrifuge entnommen. Zu ihr fügt man die gleiche Menge von zuvor durch Salzsäure schwach angesäuertem Aceton, wodurch Niederschläge erzeugt werden. Diese Niederschläge werden gesammelt und das Aceton durch Erhitzen verjagt; dann löst man das Ganze, es durch Natronlauge neutral erhaltend, in Wasser auf. Die unlöslichen Substanzen werden abfiltriert, dann das Filtrat auf dem Wasserbade getrocknet und aufs neue in Wasser aufgelöst. Diese Manipulation wird wiederholt, bis sich diese Trockensubstanz vollkommen in Wasser auflöst. Schliesslich führt man mit Alkohol und Äther hinreichende Extraktion aus.

Die so erworbene Substanz hat die gleiche kräftige blutgerinnungshemmende Wirkung, wie die 0,4 mg der Substanz in 1 ccm Kaninchenblut, das nach 90 Minuten noch ungeronnen ist, besitzen.

Otawara (1926) sagt, dass die Nucleinsäuren die Blutgerinnung hemmen, Kato (1926) nimmt an, dass die Koagulationshemmung des wässrigen Organextraktes von der Wirkung des Nucleoproteides herrührt und früher äusserten sich Schmidt, Doyon* u. a. dahin, dass die Nucleoproteide und die Nucleinsäuren auf das Plasma gerinnungsverzögernd wirken.

Um zuerst die Beziehung zwischen dieser blutgerinnungshemmenden Substanz und dem Nucleoprotein zu ermitteln, liess ich meine Untersuchung in folgender Weise vorstatten gehen:

* Hammarsten, O. (1926): Lehrbuch der physiologischen Chemie, 249.

I. Über die blutgerinnungshemmende Wirkung der Nucleinsäure und des Nucleoproteides.

Mit dem Nucleoprotein der Pferdemilz* und der bei Merek hergestellten Hefenucleinsäure habe ich die hemmende Wirkung der beiden auf die Blutkoagulation nach meiner Gerinnungsbestimmungsmethode** untersucht. Die dabei erhaltenen Resultate sind aus den Tabellen I, II und III ersichtlich:

TABELLE I.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit	
	Milznucleoprotein	Kontrolle
216	14',19"	11',32"
„	11',32"	
„	12',10"	
217	16',20"	10',47"
„	14',44"	
„	18',05"	
218	19',58"	10',20"
„	15',00"	
„	13',50"	
219	14',10"	12',42"
„	20',09"	
„	16',46"	

TABELLE II.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit	
	Milznucleoprotein	Kontrolle
218	10',58"	8',20"
„	12',28"	
„	12',43"	
219	12',48"	12',42"
„	12',26"	
„	11',48"	

* Hawk, Ph. B. (1927): Practical physiological chemistry, 194-196.

** Kashiwamura u. Katsuki (1927), siehe Literaturverzeichnis.

TABELLE III.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit	
	Hefenucleinsäure	Kontrolle
220	9',01"	8',47"
"	9',00"	
"	9',03"	
221	7',52"	7',34"
"	8',19"	
"	9',59"	

In allen Tabellen ist die Menge der zu untersuchenden Substanz für 1 cem Blut 0.5 mg.

Aus diesen Versuchsergebnissen erkennt man, dass Nucleoproteid, Nucleinsäure oder Hefenucleinsäure nur in äusserst geringem Grad die Blutgerinnung hemmen. Ich habe dann die blutgerinnungshemmende Wirkung von über 6 Jahre in unserem Institute aufbewahrter Hefenucleinsäure "Merek," welche die Farbenreaktionen mit Diazobenzolsulfonsäure und Alkali positiv ausfallen lässt, untersucht, wobei sich das Resultat ergab, das die Tabelle IV zeigt:

TABELLE IV.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit	
	Alte Hefenucleinsäure	Kontrolle
223	10',05"	10',10"
"	14',58"	
"	14',14"	
229	12',03"	7',45"
"	14',14"	
"	14',23"	

Aus der Tabelle ersieht man, dass auch alte Nucleinsäure, die die Parankörper befreit hat, auf die Gerinnung des normalen Blutes nur gering hemmend wirkt. Bei der Vergleichung dieser Resultate mit der Wirkung meiner Blutgerinnungshemmenden Substanz zeigt

sich ein sehr grosser Unterschied.

II. Beziehung zwischen der Nucleinsäure und der blutgerinnungshemmenden Substanz aus der Niere.

Wie oben gesagt, unterscheidet sich meine blutgerinnungshemmende Substanz hinsichtlich ihres Gerinnungshemmungsvermögens erheblich von Nucleoproteiden und Nucleinsäuren. Dass sich meiner Substanz bei ihrer Darstellung Nucleoproteide oder Nucleinsäuren beimischen können, ist möglich, da ihnen die Eigenschaft, sich durch Aceton oder Säure niederschlagen, gemeinschaftlich ist. Die Substanz wird also bis zu einem gewissen Grade mit den Eigenschaften von Nucleoprotein oder Nucleinsäure versehen sein können. Wenn man aber 1 g meiner blutgerinnungshemmenden Substanz mit 3 g konz. Schwefelsäure versetzt, auf dem Wasserbade 14 Stunden lang erhitzt, durch Bariumzusatz neutralisiert und an der wasserlöslichen Substanz Diazobenzolsulfonsäurereaktion ausführt, so fiel diese ganz negativ aus, woraus folgt, dass die betreffende Substanz Purinbasen oder Pyrimidinbasen nicht enthält. Ausserdem fiel auch die sich auf die Pentose, einen Bestandteil der Nucleinsäure, beziehende Reaktion von Bial (1903) und Neumann (1904) negativ aus, sowie ebenfalls die ausgeführte Fehlingsche Reduktionsreaktion. Nach diesen Versuchsergebnissen ist es wohl sichergestellt, dass meine blutgerinnungshemmende Substanz mit Nucleoprotein, Nucleinsäure oder deren Abbaustoffen nicht vermischt ist.

Dass die blutgerinnungshemmende Substanz aus der Leber die Collodiummembran nicht passieren kann, hat schon Kashiwamura (1926) erwähnt; von der aus der Niere erhaltenen Substanz gilt dies ebenfalls. Sie zeigte die Reaktion auf Stickstoff, aber nicht die Biuret-, Millonsche, Xanthoprotein- und Hopkins-Cole'sche Reaktion.

II. DIE BLUTGERINNUNGHEMMEDE SUBSTANZ UND DIE GLYKURONSÄURE, SOWIE DIE GEPAARTE GLYKURONSÄURE.

Nach den weiteren Untersuchungen von Howell (1928)

enthält das Heparin weder Stickstoff noch Phosphor, aber Kalk, ist mit Schwefelsäureradikal versehen und zeigt glykosidartige Konstitution. Nach der Hydrolyse zeigt es die Farbenreaktion der Glykuronsäure, enthält also gebundene Glykuronsäure. Die Glykuronsäure an sich wirkt nicht gerinnungshemmend, soll aber auf 250°C erhitzt das Vermögen bekommen, deutlich die Koagulation zu hemmen. Ich habe auch bei der von mir der Niere ausgezogenen gerinnungshemmenden Substanz die Glykuronsäurereaktion, wenn auch schwach, beobachtet. Die Relation zwischen der betreffenden Substanz und der Glykuronsäure wurde also zu einer interessanten Frage.

I. Beziehung zwischen der Glykuronsäurereaktion, welche die aus den verschiedenen Organen erhaltenen blutgerinnungshemmenden Substanzen geben, und der Stärke des Blutgerinnungshemmungsvermögens.

Die blutgerinnungshemmenden Substanzen, die ich und Katsuki (1927) aus verschiedenen Organen extrahiert haben, sind der Verschiedenheit der Organe entsprechend auch im Gerinnungshemmungsvermögen unterschieden; dieses wird in der Reihenfolge Niere, Milz, Lunge und Leber schwächer. Diese blutgerinnungshemmenden Substanzen habe ich auf ihre Glykuronsäurereaktion geprüft, wobei sich immer ein positives Resultat ergab. Wenn wir nun vorläufig annehmen, die blutgerinnungshemmende Substanz enthielte Glykuronsäure, so müsste die Farbenreaktion der Glykuronsäure zu der Stärke des Koagulationshemmungsvermögens in geradem Verhältnis stehen. Also habe ich von meinen aus Niere, Milz, Lunge und Leber gewonnenen blutgerinnungshemmenden Substanzen je eine 0.1%ige wässrige Lösung hergestellt und diese Lösungen unter ganz gleichen Bedingungen auf ihre verschiedenen Glykuronsäurereaktionen geprüft, was ergab, dass diese Reaktion vielmehr bei der aus der Niere erhaltenen Substanz mit dem stärksten Gerinnungshemmungsvermögen am schwächsten ausfiel. Daraus folgt, dass meine blutgerinnungshemmende Substanz zu der Glykuronsäure in keiner Beziehung zu stehen scheint. Ich setzte nun meine Versuche in der Richtung

auf die Frage, ob der Glykuronsäure eine Gerinnungshemmungswirkung zukommt oder nicht, fort.

II. Blutgerinnungshemmende Wirkung der Glykuronsäure und des Glykurons.

Nach Neuberg und Lachmann (1910) habe ich aus dem Harn eines Kaninchens dem man eine Mentholaufschwemmung per os gegeben hatte, Glykuronsäure und Glykuron dargestellt, von beiden je 0.5 mg mit 1 ccm Blut gemischt und auf das Gerinnungsvermögen geprüft, was ergab, dass die beiden Verbindungen äusserst schwach gerinnungshemmend wirken (Tabelle V).

TABELLE V.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit		
	Glykuronsäure	Glykuron	Kontrolle
227	21',35"	14',10"	13',55"
"	19',27"	16',57"	
"	23',17"	15',24"	
"	20',33"	16',20"	
228	26',36"	15',02"	19',03"
"	20',45"	19',37"	
"	25',45"	21',14"	
"	22',38"	22',50"	

Menge der zu untersuchenden Substanz für 1 ccm Blut 0.5 mg.

Der Grad dieser Wirkung ist zwar von dem meiner blutgerinnungshemmenden Substanz riesig verschieden, doch unterscheidet sich dieses Resultat von der Tatsache, dass nach Howell (1928) die Glykuronsäure gar nicht blutgerinnungshemmend wirkt.

III. Über die blutgerinnungshemmende Wirkung der auf 250° erhitzten Glykuronsäure.

Nach Howell soll, wie oben besprochen, die Glykuronsäure an sich keine Blutgerinnungshemmung bewirken, dieselbe aber herbeiführen, nachdem sie auf 250° erhitzt worden ist. Um das durch Nachprüfung festzustellen, habe ich die oben beschriebene

Glykuronsäure in zwei Teile geteilt, jeden in ein Glasrohr hineingetan und das eine verschlossen, das andere nicht. Beide brachte ich in ein Paraffinbad, dessen Temperatur allmählich auf 250° erhöht und so 1 Stunde erhalten wurde, wodurch ich eine koksartig aussehende Substanz gewann. Aus dieser extrahierte ich den wasserlöslichen Teil. Er wog bei dem verschlossen erhitzten Rohr 0.074 g (vor dem Erhitzen 0.308 g) und bei dem nicht verschlossen erhitzten 0.023 g (vor dem Erhitzen 0.127 g). Diese beiden Substanzen wurden auf ihr Koagulationshemmungsvermögen geprüft. Die Resultate sind in den Tabellen VI und VII veranschaulicht:

TABELLE VI.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit	
	Verschlossenes Rohr	Kontrolle
504	13',39"	12',36"
"	15',24"	
"	17',11"	
"	13',41"	
"	14',34"	
505	14',49"	11',14"
"	15',15"	
"	10',41"	
"	11',06"	
"	12',49"	

Menge der zu untersuchenden Substanz für 1 cem Blut 0.5 mg.

TABELLE VII.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit	
	Nicht verschlossenes Rohr	Kontrolle
229	13',45"	12',20"
"	13',50"	
"	13',40"	
"	13',46"	
"	13',46"	
230	18',35"	13'05"
"	21',55"	
"	16',05"	
"	10',34"	
"	17',35"	

Menge der zu untersuchenden Substanz für 1 cem Blut 0.5 mg.

Also stimmen meine Versuchsergebnisse nicht mit denen von Howell überein. Die Glykuronsäure wirkte auch nach dem Erhitzen auf 250° nicht blutgerinnungshemmend.

IV. *Meine blutgerinnungshemmende Substanz und die gebundene Glykuronsäure.*

Wie schon oben erwähnt, sagte Howell, dass das Heparin im Wesen eine gebundene Glykuronsäure von der Glykosidform darzustellen scheint, welche Schwefel in Form der Schwefelsäure und Kalk enthält. Um diese Verhältnisse zu studieren, löste ich 50 mg der aus der Niere erhaltenen blutgerinnungshemmenden Substanz in 10 ccm Wasser und brachte das Ganze mit 2 ccm Schwefelsäure, 10 ccm Alkohol und 20 ccm Äther in einen Scheidetrichter hinein, extrahierte 30–40 Minuten lang stark schüttelnd, und trennte die Ätheralkoholschicht ab. Dann neutralisierte ich die Mutterlauge (wässrige Lösung der blutgerinnungshemmenden Substanz) mit verdünnter Natronlauge, liess sie verdampfen, bis der Weingeistgeruch verschwand, ergänzte das Wasser und füllte zu 10 ccm auf. Die Extraktion wurde wie die vorige zweimal wiederholt. Die Ätheralkoholschicht und die Mutterlauge wurden einzeln zum Verdampfen gebracht und getrocknet, einzeln in einer kleinen Menge Wasser aufgelöst, in den Collodiumsack getan und 10 Stunden lang dialysiert. Beide wässrigen Lösungen wurden dann getrocknet. Es betrug der in Äther gelöste Teil 1.3 mg und der darin nicht gelöste 42.1 mg. Jeden löste ich wieder in 1.6 ccm Wasser, setzte 0.02 ccm dieser Lösung zu 1 ccm Blut hinzu und untersuchte auf das Gerinnungshemmungsvermögen (in diesem Falle wird die Menge der blutgerinnungshemmenden Substanz für 1 ccm Blut zu 0.5 mg). Das erzielte Resultat ist aus der Tabelle VIII ersichtlich: nachdem ich möglichst die gebundene Glykuronsäure entfernt hatte, wirkte meine blutgerinnungshemmende Substanz wie zuvor stark auf die Blutkoagulationshemmung, aber der Teil, der sich in Ätheralkohol löst und nach der Lösung in Wasser die für Glykuronsäure charakteristische Reaktion zeigt, wirkt auf die Blutgerinnung nicht hemmend, sondern, wenn auch schwach, vielmehr befördernd. Ich nahm andererseits eine bestimmte Menge der aus Niere, Milz,

TABELLE VIII.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit		
	In Aether-Alkohol lösliche Substanz	In Aether-Alkohol unlöslicher Teil	Kontrolle
231	8',25"	} nach 60 Minuten noch ungeronnen	10',15"
"	9',24"		
"	10',19"		
"	9',55"		
232	11',08"	}	11',15"
"	9',04"		
"	7',29"		
"	10',12"		

Lunge und Leber erhaltenen blutgerinnungshemmenden Substanz, zog nach der oben beschriebenen Methode unter ganz gleichen Bedingungen die gebundene Glykuronsäure aus und führte nach der Lösung in Wasser die für Glykuronsäure charakteristische Reaktion aus. Die Reaktion fiel bei der Substanz aus der Leber, die gegenüber den anderen Organen das geringste Blutgerinnungshemmungsvermögen hat, am stärksten, bei einer solchen aus der Niere, mit dem stärksten Gerinnungshemmungsvermögen, am schwächsten aus. Diese Resultate führen zu dem Gedanken, dass meine aus der Niere erhaltene blutgerinnungshemmende Substanz im Wesen mit der Glykuronsäure nicht zusammenhängt.

III. ÜBER DIE KATAPHORESE DER BLUTGERINNUNGHEMMENDEN SUBSTANZ.

Die aus der Niere extrahierte blutgerinnungshemmende Substanz enthält Stickstoff, Phosphor, Kalzium und Schwefel. Ich wollte nun die Beziehung zwischen diesen Elementen und dem Wesen der blutgerinnungshemmenden Substanz ermitteln, indem ich untersuchte, ob man bei der Kataphorese die mit der Gerinnungshemmung zusammenhängende aktive Substanz allein nach dem einen Pol verlegen kann.

Es wurde eine 5%ige Lösung der blutgerinnungshemmenden

Substanz gebraucht. Der elektrische Strom betrug anfangs um 0.2 mA herum und nach 4–5 Stunden 0.05 mA; danach er wurde nicht verändert. Ich nahm die Flüssigkeit an beiden Polen, liess sie verdampfen und trocknete. Dadurch erhielt ich vom Anodenteil eine Substanz, die gelbbraun gefärbt, amorph, fischschuppenförmig war, und vom Kathodenteil eine weisse, kristallinischen Substanz. Diese Substanzen brachte ich in einen Collodiumsack und unterwarf sie der Dialyse, bis die Chlorreaktion negativ wurde. Danach wurden sie auf dem Wasserbade getrocknet und dann gewogen. Die Menge jeder Substanz ist aus der Tabelle IX ersichtlich:

TABELLE IX.

Experiment	Menge der zur Kataphorese verwendeten Substanz in g	Nach der Anode verlegte Menge in g	Nach der Kathode verlegte Menge in g
1	0,05	0,0170	0,0014
2	0,20	0,0554	0,0146
3	0,50	0,1346	0,0072

Dann wurden die Substanzen auf ihr Blutgerinnungshemmungsvermögen untersucht, wobei sich, wie aus der Tabelle X ersichtlich, ergab, dass die nach der Anode verlegte Portion stark gerinnungshemmend wirkt, aber die nach der Kathode verlegte gar nicht.

Die elektrische Verlegung der blutgerinnungshemmenden Substanz nach der Anode hin war also bewiesen.

Der nach der Anode verlegte stark gerinnungshemmend wirkende Teil zeigt nun die Phosphor- und Schwefelreaktion, aber nicht die Stickstoff- und Kalziumreaktion. Daraus erhellt also, dass meine aus der Niere erhaltene blutgerinnungshemmende Substanz von Stickstoff und Kalk unabhängig ist.

ZUSAMMENFASSUNG.

1. Nach der Literatur und nach meinen Untersuchungen hemmen die Nucleoproteide und die Nucleinsäuren die Blutkoagulation mehr oder minder. Aber diese Wirkung ist im Vergleich mit

TABELLE X.

Kaninchen-Nr.	Gerinnungszeit		
	Nach der Anode verlegte Substanz	Nach der Kathode verlegte Substanz	Kontrolle
611	45',00"	14',54"	12',17"
"	58',00"	16',10"	
612	28',47"	9',52"	9',21"
"	29',55"	12',21"	
613	28',39"	11',39"	10',19"
"	31',01"	15',57"	
614	54',00"	19',50"	20',39"
"	27',08"	22',36"	
615	33',18"	13',35"	13',12"
"	34',54"	14',05"	
616	47',47"	6',30"	9',36"
"	50',09"	8',55"	
617	48',43"	8',30"	6',20"
"	47',58"	9',10"	

der einer von mir aus der Niere gewonnenen blutgerinnungshemmenden Substanz äusserst schwach. Die Diazobenzolsulfonsäurereaktion fällt an meiner blutgerinnungshemmenden Substanz negativ aus, die Pentosereaktion ebenfalls. "Die Substanz" zeigt die Biuret-, Millonsche, Xanthoprotein- und Hopkins-Colesche oder die Fehlingsche, Bialsche und Neumannsche u. a. Reaktionen nicht, steht also zu Nucleoproteiden, Nucleinsäuren und deren Abbauprodukten in keiner Relation. Kato schliesst seine Abhandlung mit den Worten, dass das Wesen des blutgerinnungshemmend wirkenden Bestandteiles des flüssigen Organextraktes das Nucleoprotein sein muss, aber ich glaube, dass dieser Schluss voreilig ist.

2. Meine aus der Niere erhaltene blutgerinnungshemmende Substanz gibt zwar eine schwache Glykuronsäurereaktion, aber die Stärke dieser Reaktion ist dem Gerinnungshemmungsvermögen

nicht proportional, z. B. die Substanz aus der Niere, die das stärkste Gerinnungshemmungsvermögen hat, zeigt die schwächste Farbenreaktion. Auf Grund dieser Punkte ist die Beziehung zwischen meiner aus der Niere gewonnenen blutgerinnungshemmenden Substanz und der Glykuronsäure zu negieren.

3. Howell äussert sich dahin, dass die Glykuronsäure (die aus Purree erhaltene) an sich keine Blutgerinnungshemmung herbeiführt, diese aber nach der Erhitzung auf 250° zeigt. Nach Versuch weist aber die Glykuronsäure, wenn auch schwach, das betreffende Vermögen auf, welche Eigenschaft auch beim Erhitzen auf 250° nicht verändert wird.

4. Meine blutgerinnungshemmende Substanz zeigt die Eigenschaften der gebundenen Glykuronsäure, jedoch steht der Grad der Glykuronsäurefarbenreaktion zum Gerinnungshemmungsvermögen nicht im geraden Verhältnis. Auch der Anteil, der aus meiner aus der Niere erhaltenen blutgerinnungshemmenden Substanz isoliert wurde und die Eigenschaften der gebundenen Glykuronsäure zeigt, wirkt keineswegs blutgerinnungshemmend. Auf Grund der beiden Tatsachen möchte ich betonen, dass es nicht richtig ist, das Wesen der blutgerinnungshemmenden Substanz als gebundene Glykuronsäure zu bestimmen. Aber nach Howell kann 1 mg raffinierten Heparins 100 ccm Menschenblut ungerinnbar machen; das Heparin ist also in diesem Vermögen meiner aus der Niere erhaltenen blutgerinnungshemmenden Substanz weit überlegen. Es ist daher meines Erachtens notwendig, dass man noch nach dem Howell'schen Verfahren meine blutgerinnungshemmende Substanz raffiniert und dann exakte Prüfungen anstellt, um die Frage zu lösen, ob meine aus der Niere erhaltene blutgerinnungshemmende Substanz im Wesen gebundene Glykuronsäure ist oder nicht. Die Aufklärung dieses Punktes bleibt einer zukünftigen Untersuchung vorbehalten.

5. Meine aus der Niere gewonnene blutgerinnungshemmende Substanz richtet sich in wässriger Lösung bei der Kataphorese nach der Anode; die nach der Anode verlegte Portion enthält keinen Stickstoff und keinen Kalk. Durch 0.2 mg der betreffenden Substanz kann 1 ccm Kaninchenblut bei 30° 30 Minuten lang flüssig erhalten werden.

LITERATUR.

- Bial, M. (1903): Dtsch. med. Wochenschr., **29**, 477.
Howell, W. E. (1918): American J. of physiol., **47**, 328.
Howell, W. E. (1928): Bull. of the Johns Hopkins hospital, **42**, 199.
Kashiwamura, O. (1926): Proceedings of the 30. Kyusyu medical Association, 281.
Kashiwamura, O. (1927): J. of the Kumamoto medical society, **3**, 58.
Kashiwamura, O. und Katsuki, R. (1927): Ebenda., **3**, 61.
Kashiwamura, O. (1932): Ber. d. biochem. Institut d. med. Akademie zu Kumamoto, **2**.
Kato, T. (1926): Nissin Igaku, **16**, 719.
Neuberg, C. und Lachmann, S. (1910): Biochem. Z., **24**, 416.
Neumann, A. (1904): Bln. klin. Wochenschr., **41**, 1073.
Otawara, Y. (1926): La jûrnalo de l'associo medicina de Nagasaki, **4**, 256.
Tollens, B. (1908): Ber. d. dtsch. chem. Gesellsch., **41**, 1788.

A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION OF XANTHINE OXIDASE FROM MILK.

By

JUN-ICHI TOYAMA.

(From The Institute of Medical Chemistry Kyushu Imperial University,
Fukuoka. Director: Prof. Dr. K. Kodama.)

(Received for publication, November 2, 1932)

The isolation and purification of xanthine oxidase was already described by many investigators. The method of Dixon and Kodama (1926) gives very active preparation, which is, however, rashly inactivated in the presence of air. For the further study of the kinetics of this ferment more stable and active enzym preparation is desirable. After many trials the author met with success in getting an active preparation in a simple manner from milk fat. Dixon and Thurlow (1924) noticed that upon removal of fat from milk by centrifuging there was a marked fall in the activity of the xanthine oxidase. Addition of fat restores the activity. They believed that this effect of fat might be ascribed to the catalytic action of the large surface presented by the fat globules.

It was, however, noticed by the author in the course of the experiment, that diminution of the enzym activity by removing fat from milk was due not only to the diminution of surface, but also to the actual decrease in the contents of ferment by absorption on the surface of fat molecules. It can be well demonstrated, therefore, that the milk cream itself, suspended in water, reduces methylene blue very quickly in the presence of hypoxanthine. The cream did not lose its activity by washing in water repeatedly, showing that the ferment was absorbed almost on the surface.

But when we added ether to the cream, which was rendered as free as possible from the adhering water, the fat dissolved away into ether and the white substance remained as residue, which was made into powder easily by drying in a vacuum desiccator.

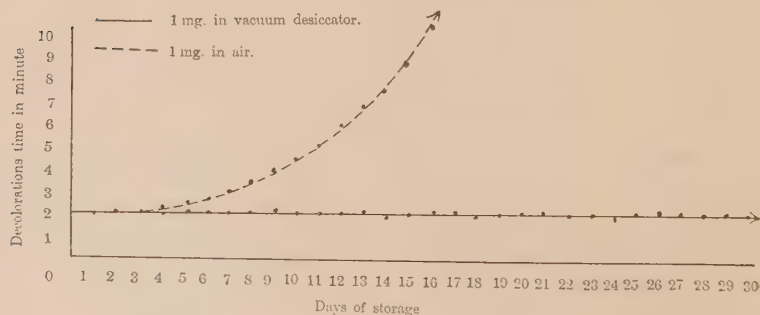
The yield was about 0.15 g from 100 cc. of milk.

This preparation was extremely powerful and stable. 1.0 mg dissolved in 1.0 cc. of phosphate buffer (pH 7.3), could decolourize 1.0 cc. of *M*/500 methyleneblue in 2 minutes in the presence of 0.2 mg of hypoxanthine. Aldehyd could serve as donator to this ferment preparation as well. Further purification by Willstätter's absorption method was tried, but without success.

The Stability of the Ferment.

This ferment preparation readily dissolves in water, giving a somewhat milky opalescent solution. In this state the activity soon deteriorates. But when kept in powder form in the absence of oxygen, the activity is maintained fairly well, as is demonstrated in the following experiment. The same sample of the ferment was divided into two parts, one of which was kept in a bottle exposed to air and another in a vacuum desiccator. The activity was tested with 1 mg of this preparation. Namely this amount was dissolved in 1.0 cc. of phosphate buffer (pH 8.0) in the Thunberg tube, with 1.0 cc. of *M*/5000 methylene blue and 1.0 cc. of hypoxanthine solution containing 0.2 mg hypoxanthine added. After being evacuated, the tube was placed in the thermostat kept at 37°C and the time required for complete decoloration was measured. The results are illustrated in the following diagram, where the ordinate represents the decoloration time and the abscissa, the days it was stored.

Fig. 1. Stability of xanthine oxidase.



The protein content of this isolated ferment is very small. With 0.1% solution, the sulfosalicylic acid reaction was negative. A slight turbidity appeared when the ferment concentration was raised to 1.0%. But the total-N content is 5.1%. Other nitrogenous substances besides protein may be responsible for this.

Uric acid test with Folin and Denis reagent is negative, but the phenol reaction is positive even with 0.1% solution of this ferment. Fe-content was 3.35 mg% which was determined by the Kennedy's method (1927). This is fairly high, suggesting some fundamental significance in the ferment activity. The total phosphor content was 0.653%, which was determined by Fiske and Subbarow (1929).

SUMMARY.

1. An active xanthine oxidase was isolated from milk cream.
2. This ferment is fairly stable in the absence of air.
3. The Fe content of this ferment is fairly large.

I wish to express my hearty thanks to professor Dr. K. Kodama for his continual interest during this work and for much helpful advice.

REFERENCES.

- Dixon, M. and Thurlow, S. (1924): *Biochem. J.*, **18**, 971.
Dixon, M. and Kodama, K. (1926): *Biochem. J.*, **20**, 1104.
Kennedy, R. P. (1927): *Jl. of biol. chemistry*, **74**, 385.
Willstätter, R. (1928): *Untersuchungen über Enzyme*, **1**, 173.

ÜBER DIE GESCHLECHTLICHEN UNTERSCHIEDE DES OXYDATIONS- UND REDUKTIONS- VERMÖGENS IN DEN GEWEBEN.

(Vierte Mitteilung)

Über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und Reduktionsvermögens in den Geweben des Hühnerembryos.

VON

SAKAE KAGIYAMA.

(Aus dem physiologischen Institut der Universität zu Nagasaki.
Direktor: Prof. Dr. D. Ogata.)

(Eingegangen am 4. November 1932)

EINLEITUNG.

In meinen früheren Mitteilungen berichtete ich über die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydoreduktionsvermögens in den Geweben einiger erwachsener Säugetiere sowie junger Kaninchen unter Anwendung der Indophenoloxidasereaktion, der Ahlgrenschen, der Warburgschen und der Kodamaschen Methode. Ich stellte dabei fest, dass das Oxydationsvermögen beim männlichen Tier stärker als beim weiblichen ist, während das Reduktionsvermögen sich umgekehrt verhält.

Eingehende Untersuchungen über das Oxydations- und Reduktionsferment des Eies oder des Embryos sind schon von vielen Forschern angestellt worden. In bezug auf Arthropoden untersuchten Verne u. Toumanov die Tyrosinase, Hasebroek die Dopaoxydase und Tyrosinase, und weiter Kobert, Zieger, Burge u. Burge, Bodine u. a. die Catalase. In bezug auf Mollusken findet man Mitteilungen von Prenant über die Peroxydase, von Zieger über die Catalase. In bezug auf Echinodermen studierten Herwerden die Indophenoloxydase, Kobert, Lyon u. Terry, Amberg u. Winternitz, Steche u. Waentig u. a. die Catalase. Bezüglich der Fische wurden Versuche über die Indophenoloxydase

von Brunelli, solche über die Catalase von Sammartino u. Pettinelli, Amberg u. Winternitz angestellt. Bezüglich der Amphibien arbeitete Voss über die Indophenoloxydase, Ostwald über die Catalase u. Peroxydase, Herlitzka über die Indophenoloxydase, Peroxydase, Catalase u. a.. Sammartino u. Pettinelli gaben den allmählichen Anstieg der Catalasenkurve in der embryonalen Periode an. Die Catalase des Embryos des Meerschweinchens wurde von Batelli u. Stern, die des Schweins von Mendel u. Leavenworth, und die Oxydase des Schweineembryos von Buxton u. Schaffer studiert.

Tokue wies die Peroxydase im Blut des 6 Monate alten Menschenembryos nach, Nicolet die Indophenoloxydase im Blut und in der Leber, und Grossi die Catalase in verschiedenen Geweben.

In bezug auf den Hühnerembryo stellte Herlitzka die Peroxydase u. die Catalase fest, und auch Rogers u. Winternitz und Rullmann bemerkten die Catalase. Tallarico zeigte, dass die Catalase im Verlauf der Bebrütung zunimmt, was auch Engelhardt u. Vaehner bemerkten, während Abelous u. Aloy auch eine allmähliche Verstärkung des Reduktionsvermögens fanden. Friedheim machte dazu Versuche über das Oxydoreduktionspotential(rH). Gondo bestimmte die Dopaoxydase- und Indophenoloxydasereaktion im Amnion und im Herzen des Hühnerembryos und behauptete, dass die Dopaoxydase am 10ten u. 11ten Bruttage am stärksten im Amnion ist, während die Granula der Indophenoloxydase am Anfang der Bebrütung überall gleichartig im Herzen liegen, danach aber mit dem Verlauf der Entwicklung abnehmen. Leider hat er die Menge der Indophenoloxydasegranula nicht quantitativ bestimmt.

Zum Studium des Gaswechsels des Hühnerembryos sind zahlreiche interessante Forschungen veröffentlicht worden (Pott u. Preyer, Bohr u. Hasselbalch, Krogh, Tangl u. Mituch, Brandes, Fukahori u. a.). Vor allem bemerkten Bohr u. Hasselbalch, dass die Kurven der Sauerstoffaufnahme und der Kohlensäureabgabe von fast gleicher Gestalt sind und mit den Kurven des steigenden Körpergewichtes fast übereinstimmen

(besonders im Verlauf nach dem 9ten Bruttage); ferner dass sie nach allmählichem Anstieg vom 2ten bis zum 17ten Bruttage einen Stillstand zeigen, und dass der respiratorische Quotient fast im ganzen Verlauf unter 0.75 ist. Fukahori hat aufgeklärt, dass die Kurven des Sauerstoffverbrauches und der Kohlensäureabgabe fast gleichartig verlaufen und ohne den von Bohr u. Hasselbalch angegebenen Stillstand bis zum 21ten Tage geradlinig ansteigen, und dass der respiratorische Quotient etwa 0.65 ist.

Über die Zunahme des Körpergewichtes des Hühnerembryos bei der Bebrütung haben Hasselbalch, Welcker u. Brandt, Minot, Murray, Needham, Hanan, Byerly u. a. ausführlich berichtet. Nach ihren Ergebnissen steigt die Kurve des zunehmenden Körpergewichtes des Embryos bis zum etwa 6ten Tage sehr allmählich an, vom etwa 6ten bis zum 11ten wird sie steiler und vom etwa 11ten bis zum letzten Bruttage noch steiler, bleibt daher die ganze Zeit convex gegen die Abszissenlinie.

Über das Oxydations- und Reduktionsferment, den Gaswechsel, das Körpergewicht des Embryos sind also zahlreiche eingehende Untersuchungen angestellt worden; leider gibt es aber—soweit die Literatur mir zugänglich ist—fast keine Forschungen, die sich auf die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydations- und Reduktionsvermögens oder Körpergewichtes beziehen. Davon ausgehend habe ich die geschlechtlichen Unterschiede die Oxydoreduktionsvermögens mittels der Indophenoloxidasereaktion (Vernonsche Methode) sowie der Entfärbungsreaktion auf Methylenblau (Ahlgrensche Methode) und die geschlechtlichen Unterschiede des Körpergewichtes bei der Bebrütung des Hühnereies studiert.

VERSUCHSMETHODIK.

Als Versuchsmaterial bediente ich mich möglichst gleich grosser, von unter gleichen Bedingungen ernährten Hennen frisch gelegter Eier, und liess diese Eier eine bestimmte Frist im Brutschrank stehen. Zu den Versuchen wurden Herzen und Gehirne verwendet, die von eine bestimmte Anzahl Tage lang bebrüteten Hühnereiern herrührten. Die Versuche über das Herz wurden vom 13ten Bruttage an ausgeführt, weil dieses Organ vorher für

meine Untersuchungen zu klein war. Vom 5ten bis zum 7ten Bruttage untersuchte ich ohne Berücksichtigung des Geschlechtes das Verhalten des Oxydoreduktionsvermögens von gründlich zerriebenen und vermischten ganzen Körpern, wegen der Schwierigkeit der makroskopischen Beurteilung der geschlechtlichen Differenzierung und der Schwierigkeit der Exstirpierung des Gehirns und Herzens. Zur Bestimmung des Oxydations und Reduktionsvermögens wurden die in meiner ersten Mitteilung ausführlich beschriebenen Verfahren von Vernon und von Ahlgren benutzt. Man versteht unter dem Oxydationsvermögen in den Tabellen das Verhältnis der Konzentration derjenigen Flüssigkeit, die man durch alkoholisches Extrahieren vom durch Indophenolreagens hervorgerufenen Indophenolblau bekommt, zu der der Kontrolllösung. Das Reduktionsvermögen in den Tabellen ist als die Ziffer der Entfärbungszeit des Methylenblaus aufzufassen. Deshalb entspricht beim Oxydationsvermögen die grössere Zahl einem stärkeren Oxydationsmögen, während beim Reduktionsvermögen das Verhältnis umgekehrt ist.

VERSUCHSERGEBNISSE.

A. Oxydoreduktionsvermögen im 5–8 Tage lang bebrüteten Hühnerembryo.

Das Oxydationsvermögen im 6 Tage-Embryo scheint beträchtlich stärker als das im 5 Tage-Embryo, und etwas schwächer als das im 7 Tage-Embryo zu sein. Das Reduktionsvermögen im 6 Tage-Embryo ist gleichstark wie am 5ten Tage und etwas schwächer als am 7ten. Das Oxydationsvermögen des Gehirns im 8 Tage-Embryo ist fast so stark wie das des ganzen Körpers im 7 Tage-Embryo, während das Reduktionsvermögen des Gehirns am 8. Tage auffallend stärker als das des ganzen Körpers am 7. Tage ist. Das Körpergewicht steigt mit den Bruttagen ganz allmählich an.

B. Oxydoreduktionsvermögen im 9–12 Tage lang bebrüteten Hühnerembryo.

In dieser Brutperiode zeigte das Oxydationsvermögen eine

Oxydations- und Reduktionsvermögen in den Geweben. 139

TABELLE I. (a)

Oxydationsvermögen des Hühnerembryos

B-Tage = Bebrütungstage

K-Gewicht = Körpergewicht

Oxyd.-Vermögen = Oxydationsvermögen

V-Zahl = Versuchszahl

B-Tage	K-Gewicht (g)	Organ	Oxyd.-Vermögen	V-Zahl
5	0.2	ganz. Körper	1.3	4
6	0.4	"	1.6	4
6	0.4	"	1.8	4
7	0.7	"	1.6	3
7	0.8	"	2.1	3
8	1.2	Gehirn	2.0	10

TABELLE I.

(b). Oxydationsvermögen des Hühnerembryos.

B-Tage	Körpergewicht (g)		Herz		Gehirn		V-Zahl	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
9	1.4	1.5			2.1	1.9	4	7
10	2.1	2.2			2.2	1.6	7	6
11	3.2	3.2			2.3	2.3	8	8
12	4.2	3.6			2.3	2.2	9	7
13	6.4	6.0	7.1	6.9	2.4	2.1	6	7
14	8.6	7.6	7.4	6.9	3.4	3.1	8	10
15	9.9	10.2	6.3	6.2	3.5	4.0	5	5
15	9.2	8.7	5.6	5.4	3.5	2.6	7	4
16	14.2	13.1	8.3	7.2	4.9	4.9	5	4
16	13.3	12.8	7.4	6.7	4.8	4.2	6	6
16	15.8	12.5	7.9	7.5	3.9	3.7	7	7
17	16.4	16.1	8.7	8.2	4.7	4.6	6	5
17	14.7	15.0	8.7	8.0	4.9	3.8	3	7
17	14.8	14.8	7.7	7.0	4.5	4.5	4	6
18	18.0	19.1	11.5	10.0	5.4	4.7	6	5
18	20.9	22.1	10.3	9.1	6.7	6.4	6	3
18	20.1	20.0	10.5	10.0	—	—	1	2
19	26.8	26.6	12.3	11.8	7.1	5.7	2	9
19	24.2	23.2	11.0	9.1	6.8	7.1	7	4
20	28.6	25.9	12.1	10.5	6.9	6.6	4	6
20	23.8	25.9	13.2	12.1	7.9	7.2	3	2
21	28.5	27.7	13.3	12.8	8.7	8.4	5	7
21	30.4	29.5	13.1	12.4	9.4	8.4	2	3

geringe Zunahme mit dem Verlauf der Bebrütung. Vergleicht man den männlichen und den weiblichen Embryo in bezug auf dieses Vermögen, so scheint es schon jetzt beim ersteren etwas stärker als beim letzteren zu sein, wenn auch dieser Unterschied

TABELLE II. (a)

Reduktionsvermögen des Hühnerembryos.

Red.-Vermögen = Reduktionsvermögen.

M. = Minuten.

S. = Sekunden.

B-Tage	K-Gewicht (g)	Organ	Red.-Vermögen	V-Zahl
5	0.3	ganz. Körper	M. S. 14.15	5
6	0.5	„	14.15	3
7	0.8	„	14.11	4
8	1.3	Gehirn	9.31	12

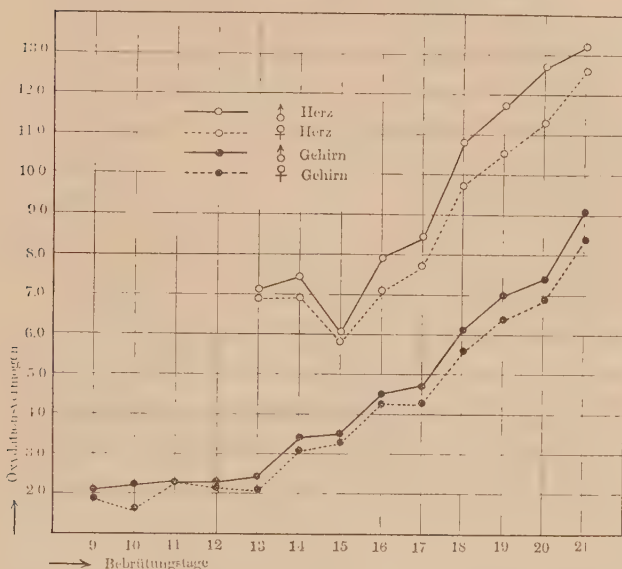
TABELLE II.

(b). Reduktionsvermögen des Hühnerembryos.

B-Tage	Körpergewicht (g)		Herz		Gehirn		V-Zahl	
	♂	♀	♂	♀	♂	♀	♂	♀
9	1.5	1.4			M. S.	M. S.		
10	2.6	2.6			8.39	8.33	4	6
11	3.9	3.8			8.22	8.22	4	4
12	5.4	4.6	M. S.	M. S.	8.28	8.26	3	5
13	7.5	7.1	7.56	7.13	8.26	7.45	5	5
13	6.4	6.1	—	—	7.35	7.27	5	5
14	9.3	9.0	7.20	7.05	7.30	7.09	1	1
14	8.8	—	7.35	—	7.25	7.25	5	4
15	10.2	8.6	7.32	6.55	7.40	—	2	—
15	11.7	12.3	7.13	7.00	8.04	7.50	4	5
15	12.3	9.5	—	—	7.07	6.51	2	4
15	12.3	—	7.18	—	7.15	6.41	1	1
16	11.5	12.3	7.37	7.22	7.28	—	2	—
16	14.0	12.2	7.23	7.21	8.02	7.34	3	3
16	15.9	12.0	7.03	7.06	7.50	7.30	2	1
17	18.6	17.7	7.00	6.18	7.00	7.22	7	5
17	15.8	15.2	6.35	6.13	7.47	7.14	5	5
17	16.3	15.7	6.35	6.28	6.20	5.58	3	3
18	19.1	20.1	6.43	5.28	6.16	5.47	2	1
18	19.2	18.0	6.50	6.16	7.04	7.13	6	4
19	25.8	—	6.08	—	6.45	6.02	6	5
19	26.0	26.3	6.10	5.53	6.18	—	2	—
20	28.7	28.4	5.18	4.27	6.11	5.54	4	6
20	28.1	27.4	5.57	4.57	6.03	5.47	5	3
21	28.8	28.8	5.07	4.22	6.09	5.28	3	3
21	27.4	—	5.14	—	5.25	5.09	1	6
21	31.2	—	3.56	—	5.00	—	1	—
					5.40	—	3	—

noch nicht sehr auffallend ist. Das Reduktionsvermögen verstärkt sich bis zum 11-12ten Bruttage allmählich, aber am 12-13ten Bruttage erfolgt ein ganz lebhafter Anstieg besonders beim weib-

Fig. 1. Oxydationsvermögen des Hühnerembryos.

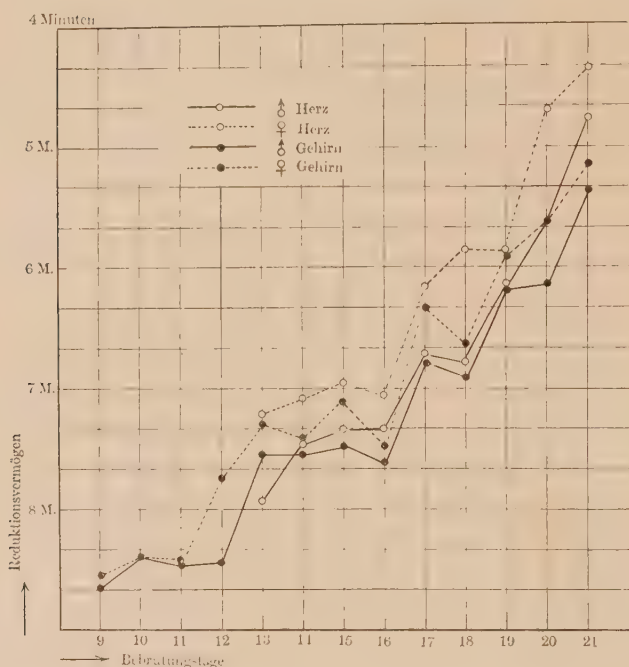


lichen Embryo. Am 12ten Tage ist der geschlechtliche Unterschied im Reduktionsvermögen schon deutlich ausgeprägt, indem das Reduktionsvermögen des weiblichen Embryos stärker als das des männlichen ist, welcher Unterschied bis zum 11ten Tage nur andeutungsweise aufweisbar war. Die Zunahme des Körpergewichtes des Embryos in dieser Periode ist zwar viel deutlicher als vorher, aber der geschlechtliche Unterschied ist noch nicht bemerkbar.

C. Oxydoreduktionsvermögen im 13–21 Tage lang bebrüteten Hühnerembryo.

Das Oxydationsvermögen verstärkt sich mit dem Verlauf der Bebrütung allmählich und der geschlechtliche Unterschied wird dabei immer deutlicher, d. h. das Vermögen ist beim männlichen Embryo stärker als beim weiblichen. Das Oxydations- und Reduktionsvermögen sowohl vom männlichen Embryo als auch vom weiblichen erweist sich beim Herzen stärker als beim Gehirn. Das Reduktionsvermögen in dieser Periode zeigt zwar ziemlich starke

Fig. 2. Reduktionsvermögen des Hühnerembryos.

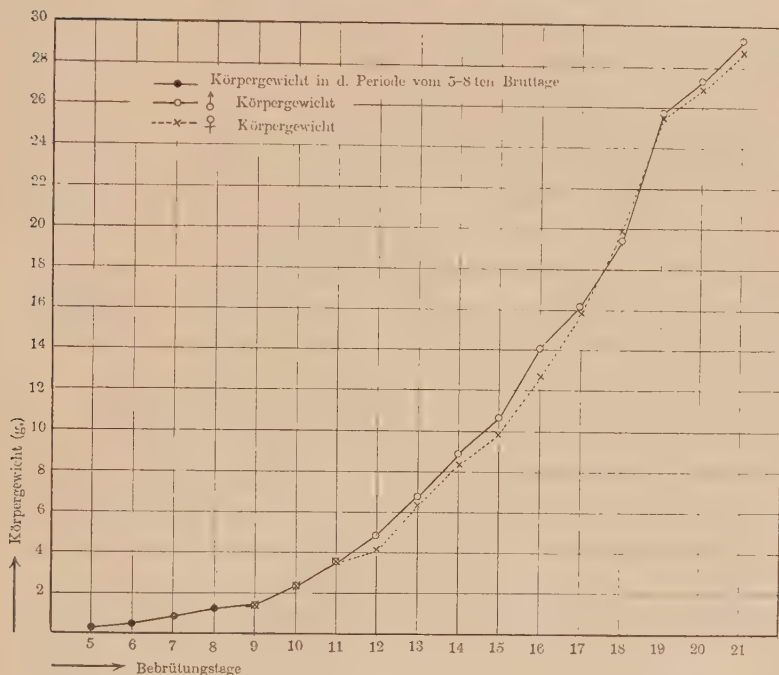


Schwankungen, aber im allgemeinen einen allmählichen Anstieg mit dem Verlauf der Bebrütung; dabei ist es beim weiblichen Embryo stärker als beim männlichen. Das Körpergewicht vermehrt sich in dieser Brutperiode kontinuierlich, und das der männlichen Embryonen ist immer grösser als das der weiblichen mit Ausnahme des 18ten Bruttages. Es ist sehr merkwürdig und gleichzeitig sehr interessant, dass die Kurve des Oxydationsvermögens des Herzens trotz des sonst glatten und kontinuierlich ansteigenden Verlaufs am 15ten Bruttage plötzlich eine Senkung aufweist, und dass die Kurve des Reduktionsvermögens ziemlich starken Schwankungen unterworfen ist. Diese Frage muss aber erst durch noch weitere Forschungen aufgeklärt werden.

DISKUSSION.

Durch Beobachtung des Oxydoreduktionsvermögens und

Fig. 3. Körpergewicht des Hühnerembryos.



Körpergewichtes im ganzen Verlauf der Bebrütung des Hühnerembryos bemerkt man, dass der auffallende Anstieg des Oxydationsvermögens von etwa dem 14ten Bebrütungstage an zutage tritt, der des Reduktionsvermögens etwas früher vom 12-13ten Bebrütungstage an, während der des Körpergewichtes etwa nach Verlauf von 10 Tagen eintritt. Die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydationsvermögens scheinen vom etwa 13ten Bruttage an zutage zu treten, die des Reduktionsvermögens vom etwa 12ten, die des Körpergewichtes vom etwa 12ten Tage an. Die Kurve der Körpergewichtszunahme stimmt fast mit den von den oben angeführten Autoren angegebenen Kurven, und besonders gut mit denen von Minot und Murray, überein.

Die embryonale Entwicklung der Geschlechtsorgane ist schon vor langer Zeit von Nussbaum, Schmiegelow, Semon, Hertwig, Sonnenbrodt, Swift, Lillie u. a. eingehend behandelt

worden. Für den Zeitpunkt der Geschlechtsdifferenzierung hält Hertwig den 5ten–6ten Brutttag, während Swift und Lillie den 6.5–7ten Brutttag angeben. Nach Swiftscher Anschauung entwickelt sich das Ovarium rasch am 9–10–11ten Bruttage, wo man die lebhaftte Entwicklung des Keimepithels und die starke Vermehrung sowie die Teilung der Primordialkeimzellen bemerkt. Er gab noch dazu an, dass die Primordialkeimzellen des Hodens vom etwa 13ten Bruttage an sich lebhaft vermehren und teilen, und dass die Zwischenzellen auch am etwa 13ten Bruttage auftreten. Die äussere Gestalt des Embryos entwickelt sich fast vollständig am etwa 11ten Bruttage, wo man die Brustwand, Bauchwand, die lebhaftte Bewegung der Extremitäten und die Form der Schlinge des Darmkanals bemerkt. Deshalb kann man vermuten, dass die deutliche Entwicklung des Ovariums und Hodens von etwa 9–13ten Bruttage an beginnt. Es ist interessant, dass diese Entwicklungszeit des Ovariums und des Hodens mit der Periode des ersten deutlichen Auftretens der geschlechtlichen Unterschiede des Oxydoreduktionsvermögens und des Körpergewichts fast übereinstimmt, und dass das Reduktionsvermögen beim weiblichen Embryo früher als beim männlichen sich auffallend verstärkt.

ZUSAMMENFASSUNG.

Aus obigen Versuchen komme ich zu folgenden Schlüssen:

1. Die geschlechtlichen Unterschiede des Oxydationsvermögens scheinen am etwa 13ten Bruttage sichtbar zu werden, nämlich das Oxydationsvermögen beim männlichen Hühnerembryo wird dann stärker als das beim weiblichen. Das Oxydationsvermögen des Embryos verstärkt sich deutlich erst vom etwa 14ten Bruttage an, wenn auch eine ganz allmähliche Verstärkung noch früher zu beobachten ist. Dieses Vermögen ist beim Herzen stärker als beim Gehirn.

2. Die geschlechtlichen Unterschiede des Reduktionsvermögens scheinen am etwa 12ten Bruttage aufzutreten, d. h. das Reduktionsvermögen beim weiblichen Hühnerembryo erweist sich in dieser Periode als stärker als beim männlichen. Das Reduktions-

vermögen des Embryos steigt zwar ganz schleichend bis zum etwa 11–12ten Bruttage an, aber vom etwa 12–13ten Bruttage an erfolgt ein auffallender Anstieg. Dieses Vermögen ist beim Herzen stärker als beim Gehirn.

3. Dieses Oxydations- und Reduktionsvermögen hat vermutlich eine innige Beziehung zu der Entwicklung der Geschlechtsorgane.

4. Die Zunahme des Körpergewichts steigt nach dem etwa 10ten Bebrütungstage auffallend an. Jedoch bemerkt man einen geschlechtlichen Unterschied im Körpergewicht erst beim etwa 12 Tage lang bebrüteten Hühnerembryo, wo dann die Überlegenheit beim männlichen Embryo ist.

5. Die gesamten Ergebnisse beim Embryo sind also im grossen und ganzen gleich den Resultaten, welche ich sowohl bei erwachsenen als auch bei jungen Säugetieren fand und in früheren Mitteilungen schon veröffentlicht habe.

LITERATUR.

- Abelous u. Aloy (1903): Comtes Rend. Soc. Biol., **55**, 711.
 Amberg u. Winternitz (1911): Journ. Biol. Chem., **10**, 295.
 Batelli u. Stern: zit. nach Needham (1931): Chemical Embryology, **3**, 1316.
 Bodine (1921): Journ. Exp. Zool., **34**, 143.
 Bohr u. Hasselbalch (1903): Skand. Arch. f. Physiol., **14**, 398.
 Brandes (1924): Pflügers. Arch. f. d. ges. Physiol., **203**, 492.
 Brunelli (1925): zit. nach Rona's Berichte, **35**, 237.
 Burge u. Burge (1921): Amer. Journ. Physiol., **56**, 29.
 Buxton u. Shaffer (1905): Journ. Med. Res., **13**, 549.
 Byerly (1930): Anat. Rec., **45**, 208.
 Engelhardt u. Vaehner: Zit. nach Needham (1931): Chemical Embryology, **3**, 1307.
 Friedheim (1929): Comptes Rend. Soc. Biol., **101**, 1039.
 Fukahori (1932): Nagasaki Igakkai Zassi, **11**.
 Gondo (1927): Nagasaki Igakkai Zassi, **5**, 509.
 Gondo (1928): Igaku Kenkyu, **2**, 1.
 Hanau (1928): zit. nach Rona's Berichte, **46**, 448.
 Hasebroek (1922): Fermentforschung, **5**, 1.
 Hasselbalch (1900): Skand. Arch. f. Physiol., **10**, 353.
 Herlitzka (1907): Arch. Ital. de Biolog., **48**, 119.
 Hertwig (1906): Handbuch d. Entwicklungslehre d. Wirbeltiere, **3**, 1710.

- Herwerden (1913/1914): Arch. Internat. de Physiol., **13**, 359; **14**, 85.
Kagiya (1932): Nagasaki Igakkai Zassi, **10**, 404; **10**, 1261.
Kagiya (1932): Journ. Biochem., **16**, 99.
Kobert (1903): Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., **99**, 116.
Krogh (1906): Skand. Arch. f. Physiol., **18**, 398.
Lillie (1919): The Development of the Chick.
Lyon u. Terry (1907): Centralbl. f. Physiol., **21**, 476.
Mendel u. Leavenworth (1907/1908): Amer. Journ. Physiol., **20**, 117;
21, 85.
Minot: zit. nach Needham (1931): Chemical Embryology, **1**, 384.
Murray (1926): Journ. gen. Physiol., **9**, 39.
Needham (1927): Brit. Journ. Exp. Biol., **4**, 258.
Nicole (1927): Zeitschr. f. mik. anat. Forsch., **10**, 602.
Nussbaum (1880): Arch. f. mikr. Anat., **18**, 1.
Ostwald (1907): Biochem. Zeitschr., **6**, 409.
Pott u. Preyer (1882): Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., **27**, 320.
Prenant (1921): Comptes Rend. Soc. Biol., **85**, 808.
Rogers u. Winternitz (1910): Journ. Exp. Med., **12**, 12.
Rullmann (1916): Zentralbl. f. Bakteriolog., **45**, 219.
Sammartino u. Pettinelli (1924): Zit. nach Rona's Berichte, **30**, 483.
Schmiegelow (1882): Arch. f. Anat. u. Physiol., Jahrgg., **1882**, 157.
Semon (1887): Jen. Zeitschr. Naturwiss., **21**, 46.
Sonnenbrodt (1908): Arch. f. mikr. Anat., **72**, 415.
Swift (1915): Amer. Journ. Anat., **18**, 441; (1916) **20**, 375.
Tallarico: zit nach Needham (1931): Chemical Embryology, **3**, 1307.
Tangl u. Mituch (1908): Pflügers Arch. f. d. ges. Physiol., **121**, 437.
Tokue (1929): Tohoku Journ. Exp. Med., **12**, 281.
Toumanov (1926): Comptes Rend. Soc. Biol. **95**, 372.
Voss (1924): Arch. f. mikr. Anat. u. Entw., **100**, 560.
Weleker u. Brandt (1903): Arch. f. Anthropol., **28**, 1.
Zieger (1915): Biochem. Zeitschr., **69**, 68.

THE ACTION OF SUGAR ON AMINO ACID.

II. The Reaction in the Presence of Oxidizing Agents.

By

JŪKICHI WATANABE.

(From the Department of Biochemistry, Niigata Medical College, Niigata.
Director: Prof. N. Ariyama.)

(Received for publication, November 24, 1932)

With the object of studying the reaction between sugar and amino acid while they are in process of disintegration, a series of investigations has been made. In a previous paper (1932) an account was given of this reaction in the alkaline medium. The reaction in the presence of oxidizing agents will be shown in this paper. Fosse (1919-1922) pointed out that urea was produced when sugars, aldehydes, alcohols, fatty acids and other substances were oxidized by KMnO_4 in the presence of concentrated ammonia. Amino acids were capable of replacing ammonia. Fearon and Montgomery (1924) concluded from oxidation-experiments *in vitro* that oxidative deamination of the amino acid involved the intermediate formation of cyanic acid, and that the production of this acid was favoured by the addition of glucose or formaldehyde. Borsook and Wasteneys (1925) studied the oxidation of glycine by H_2O_2 at various pH with and without glucose.

I. THE MEASURING METHODS.

In the cases where H_2O_2 was employed as the oxidizing agent, the sugar was determined by Somogyi method after removing H_2O_2 by manganese dioxide. When KMnO_4 was used, polarimetry was the only method available for the determination of the sugar. The amino acid was estimated by van Slyke's method after removing ammonia by permutit; ammonia was determined either by the van Slyke-Cullen method or by the permutit-Nesslerization method. Urea was weighed as xanthylurea by treating it with

glacial acetic acid and xanthyrol. Cyanic acid was first converted into urea by evaporating its solution with ammonium chloride on the water-bath and then determined as xanthylurea. The true value of cyanic acid was calculated indirectly from the difference between the quantity of the total urea thus measured and that of free urea. Cyanic acid was also determined directly by converting it into urea and weighing as xanthylurea after the removal of the preexisting urea by urease. There was a good agreement between the results obtained by these two methods. For the determination of cyanic acid Fearon and Montgomery preferred the incubation of the mixture of cyanic acid and ammonium chloride overnight at room temperature, to the evaporation on the water-bath, since the latter method led to loss of some cyanate. It was found in the present experiments that the low yield of cyanate by the evaporation method was due to the hydrolysis of cyanate in the solution which became gradually acid during evaporation. Cyanic acid was found to be determined accurately by the evaporation method if the reaction of the solution was constantly kept slightly alkaline during the evaporation by the continuous addition of dilute alkali. Upon recrystallization from pyridine the dixanthylurea preparations obtained directly from urea and indirectly from cyanic acid were proved to be analytically pure.

II. REACTION IN THE PRESENCE OF PERMANGANATE.

REACTION IN THE PRESENCE OF PERMANGANATE.

I. Reaction in Alkaline Medium.

10 cc. of *M* amino acid solution and varying quantities of sugar and of permanganate were diluted up to 100 cc. with alkaline solutions (pH 9.2 and pH 10.1 carbonate-bicarbonate buffer solutions; 0.32 *M* NaHCO_3 -, 0.1 *N* KOH- and 0.5 *N* NaOH-solutions). The factors determined periodically were as follows: the decrease of amino acid, sugar and permanganate; the production of ammonia, urea and cyanic acid.

A. Reaktion in 0.5 N NaOH-solution.

The experiments were arranged with increasing quantities of

glucose, the molar ratio of which to glycine was 0.1:1.0, 0.3:1.0 and 0.5:1.0 respectively. The amount of permanganate was 4.0 gm. The temperature was 37°C. It should be noted that all the solution "coagulated" suddenly several minutes after the start of the experiments and a deep brown gelatinous mass was formed. Upon filtering this gelatinous mass, the permanganate-colored filtrate was obtained. All the determinations were carried out in this filtrate. Urea and cyanic acid were not determinable, since they were decomposed by the procedure of removing permanganate from the filtrate. However, after a sufficient length of time, the filtrate of the coagulum became colorless; it was now possible to determine cyanic acid and urea in this colorless filtrate. A condensed summary of the results is given in Table I.

The most notable feature was the inhibitory effect of glucose on the oxidative deamination of glycine and on the production of ammonia. This rather unexpected action of glucose was more marked with the increasing quantity of the sugar. Another evidence to be emphasized was that the reaction scarcely advanced any further after the development of "coagulation"; the coagulation of the solution resulted in the almost complete stoppage of the reaction. Since the coagulation occurred very soon after the start of the reaction, the reaction, if any, between amino acid and sugar must have taken place during a short period before the coagulation began. The depressive effect of glucose manifested itself not only on deamination and on the production of ammonia but on the rate of the decrease of permanganate and of the production of acidity. The absolute quantities of permanganate which decreased and of acid which increased were greater in the presence of glucose than in its absence and still greater with the increasing amount of the sugar. However, the values were always less than the sum of those of the cases where amino acid and sugar were treated singly. The rapid disappearance of permanganate from the reacting solution in the presence of glucose might possibly be one of the reasons for the retarding action of glucose on deamination. Glucose disappeared quite rapidly; after the lapse of an hour, there was no trace of it in the solution.

TABLE I.
Action of Glucose on Glycine in the Presence of KMnO_4 and 0.5N NaOH-Solution.
In 100 cc.: 750 mg. glycine, varying amounts of glucose (180, 540 and 900 mg.), 40 gm. KMnO_4 , 37°C. Molar ratio between glycine and glucose = 1:0.1, 1:0.3, 1:0.5.

Time (min.)	Decrease of glycine (mg.)		Production of ammonia (mg.)			Decrease of permanganate (gm.)				Increase of acidity (cc. N solution)												
	Glycine alone	+ Glucose	+ Glucose			Glucose + glycine, glucose alone				Glucose + glycine, glucose alone												
			Molar ratio, glycine: glucose	Molar ratio, glycine: glucose			Molar ratio, glycine: glucose				Molar ratio, glycine: glucose											
				1:0.1	1:0.3	1:0.5	1:0.1		1:0.3		1:0.5		1:0.1		1:0.3		1:0.5					
							+ Glycine	Alone	+ Glycine	Alone	+ Glycine	Alone	+ Glycine	Alone	+ Glycine	Alone	+ Glycine	Alone				
10	663.1	650.2	439.7	349.1	107.2	97.0	49.4	31.2	2.349	2.386	1.735	3.004	2.421	3.456	3.067	6.50	8.73	3.05	10.96	7.10	13.80	12.12
30	677.5	669.6	461.5	365.0	107.9	105.2	50.1	32.7	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
60	684.9	673.3	467.2	367.4	108.9	105.5	51.1	32.7	2.420	2.884	1.871	3.049	2.577	3.555	3.225	6.70	9.14	3.25	11.36	7.31	14.70	12.17
180	696.2	680.5	478.3	371.6	119.6	107.7	56.9	34.7	2.656	2.895	1.884	3.057	2.579	3.557	3.230	7.71	9.64	3.25	11.57	7.31	14.90	12.17

For the above reason it was decided to lower the alkalinity and the temperature so as to let the coagulation take place more slowly. At pH 10.1 and 37°C., and pH 9.2 and 20°C., the reaction proceeded still so rapidly that the coagulation developed already after about 6 minutes in the former and after 10 minutes in the latter conditions. The presence of glucose showed again the retarding effect on deamination under these conditions.

B. Reaction at pH 8.1.

By lowering the alkalinity and the temperature to pH 8.1 (0.32 *M* NaHCO₃) and 5°C., the conditions were at last obtained where the time, before the development of the coagulation, was of sufficient length for examining the true feature of the reaction. Under these conditions the reacting mixture slowly became gelatinous after 120 minutes in the absence of glucose, and it coagulated suddenly after 20 or 30 minutes in the presence of a relatively small amount of glucose and after 10 or 20 minutes in the cases of larger quantities. As the filtrate was permanganate-free, urea and cyanic acid were determined along with ammonia. It should be emphasized that glucose showed definitely an accelerating effect on deamination until the coagulation appeared. This accelerating effect was more remarkable when the quantity of glucose was increased. However, as soon as the coagulation developed, deamination stopped dead. Since the coagulation took place at a much earlier stage in the presence of glucose than in its absence, the deamination became gradually more marked in the latter case after the lapse of a sufficient length of time. In all probability it was this fact that gave glucose the apparent retarding effect on deamination after the lapse of several hours. The stronger inhibiting action of glucose in the presence of the larger amount of it might be explained in the same way. The results are given in Table II.

The accelerating action of glucose on deamination at an early stage of the reaction was also revealed from the feature of ammonia production. Thus the yield of ammonia was greater with the increasing quantity of glucose. However, the relation became

TABLE II.
Action of Glucose on Glycine in the Presence of KMnO_4 at pH 8.1.
In 100 cc.: 750 mg. glycine, varying amounts of glucose (180, 540 and 900 mg.), 2.0 mg. KMnO_4 , 40 cc. 0.8M NaHCO_3 , 5°C. Molar ratio between glycine and glucose = 1:0.1, 1:0.3, 1:0.5.

Time	Decrease of glycine (mg.)			Production of ammonia (mg.)			Production of cyanic acid (mg.)							
	Glycine alone	+ Glucose			Glycine alone	+ Glucose			Glycine alone	+ Glucose				
		1:0.1	1:0.3	1:0.5		Molar ratio, glycine: glucose	1:0.1	1:0.3		1:0.5	Molar ratio, glycine: glucose	1:0.1	1:0.3	1:0.5
2 min.	179.1	203.8	238.1	279.9	12.7	16.6	18.7	22.5	—	—	—	—		
5 "	253.6	275.7	293.7	310.3	18.2	21.5	22.9	23.8	—	—	—	—		
10 "	299.4	324.0	323.3	*318.7	—	—	—	—	—	—	—	—		
20 "	360.3	373.0	346.2	322.5	26.9	30.3	24.2	23.8	—	—	—	—		
30 "	396.5	388.1	*353.9	324.8	—	—	—	—	—	—	—	—		
60 "	475.2	*431.3	353.9	325.0	35.1	32.0	25.5	23.8	—	—	—	—		
180 "	*594.7	433.1	355.1	326.0	38.1	32.0	26.4	24.7	—	1.9	0.8	0		
24 hr.	662.4	447.5	367.0	332.4	41.7	32.3	28.9	25.5	2.1	1.1	0.6	0		

* "Coagulation" began

reversed after the appearance of the coagulation; the yield became smaller in the presence of a larger amount of glucose.

Fearon and Montgomery stated that the addition of glucose reduced the production of ammonia from glycine while it accelerated remarkably the formation of cyanic acid. Urea was "present" whether glucose was used or not. The same did not, however, hold true for other amino acids. The results were rather confused. Fearon and Montgomery attributed this difference between glycine and other amino acids to different forms of deamination. The writer has never found such an irregularity in the results of the present experiments. There was always introduced the simultaneous depression of the production of ammonia, cyanic acid and urea by the presence of glucose, so far as glucose showed the inhibitory effect on any amino acid (Table III). This

TABLE III.

Production of Ammonia, Cyanic Acid and Urea.

In 100 cc.: 750 mg. glycine, 180 mg. glucose, 1.8 gm. KMnO_4 ,
10 cc. N KOH. 45°C.

Time (hr.)	Glycine alone or +glucose	Decrease of glycine (mg.)	Production of NH_3 (mg.)	Production of urea (mg.)	Production of HNCO (mg.)
1	Glycine alone	653.5	86.8	2.3	25.5
	+Glucose	453.2	59.2	—	9.0
3	Glycine alone	657.0	90.2	4.1	23.5
	+Glucose	460.0	61.3	0.5	6.5
24	Glycine alone*	672.7	103.0	7.4	19.3
	+Glucose*	468.5	66.8	0.7	5.1
48	Glycine alone	678.8	110.7	9.2	15.9
	+Glucose	471.7	68.5	0.9	4.0

* The same conditions as in Fearon-Montgomery's experiments.

is to be explained simply by the stoppage of deamination at an early stage in the presence of glucose. That Fearon and Montgomery postponed the determinations to the next day, waiting for the completion of the reaction, was of no significance. The

main changes in the solution after the appearance of the coagulation were the slow increase of the yields of ammonia and urea, and the slow decrease of that of cyanic acid.

II. *Reaction in Acid Medium.*

The accelerating effect of glucose deamination in the presence of permanganate was more marked in the acid medium than in the alkaline. In the present experiments, 10 cc. of *M* glycine or alanine solution, 1, 2, or 3 cc. of *M* glucose solution and 3 gm. of KMnO_4 were diluted to 100 cc. with sulphuric acid, the final concentration of which was 0.5*N*. The temperature was 37°C.

The oxidation of the amino acid which took place quite slowly in a solution of amino acid only, was greatly accelerated by the presence of glucose. However, this accelerating effect of glucose ran down soon after, as glucose was rapidly consumed by acid permanganate. The yield of ammonia from the amino acid was also much increased by the addition of the sugar. Urea was never detected in the reacting mixture. The data are listed in Table IV.

It will be seen in the table that after the lapse of 24 hours the deamination and the production of ammonia were rather inhibited in the presence of glucose. This was due to the fact that manganese dioxide was precipitated from the solution more rapidly in the presence of glucose, leaving the supernatant, water-clear solution which showed no further deamination. The precipitation of manganese dioxide reached the maximum after 60 minutes in the presence of glucose, while the precipitation began to take place quite slowly within a couple of hours in the absence of glucose.

III. REACTION IN THE PRESENCE OF HYDROGEN PEROXIDE.

Fearon and Montgomery observed that the oxidation of the amino acid by neutral hydrogen peroxide and ferrous sulphate resulted in the production of cyanic acid and urea, while Borsook and Wasteneys stated that neither cyanic acid nor urea was found in the presence of glucose at various pH.

In the present experiments, the reactions between amino acids

TABLE IV.

Action of Glucose on Glycine and Alanine in the Presence of KMnO_4 and $0.5N \text{ H}_2\text{SO}_4$ -Solution.

In 100 cc.: 750 mg. glycine or 890 mg. alanine, varying amounts of glucose (180, 360 and 540 mg.), 3.0 gm. KMnO_4 , 10 cc. $5N \text{ H}_2\text{SO}_4$, 37°C .

Molar ratio between glycine and glucose = 1:0.1; 1:0.2; 1:0.3.

Time	Amino acid: glucose	Decrease of amino acid (mg.)		Production of ammonia (mg.)	
		Glycine	Alanine	Glycine	Alanine
5 min.	Amino acid alone	3.8	2.4	± 0	0.1
	1:0.1	45.3	—	—	—
	1:0.2	87.8	—	—	—
	1:0.3	129.6	47.4	1.2	1.1
10 "	Amino acid alone	7.6	2.7	0.7	0.1
	1:0.1	103.2	—	—	—
	1:0.2	108.7	—	—	—
	1:0.3	206.0	85.4	7.4	1.8
20 "	Amino acid alone	17.3	4.6	1.1	0.1
	1:0.1	121.5	—	—	—
	1:0.2	194.8	—	—	—
	1:0.3	223.7	134.9	12.3	4.2
60 "	Amino acid alone	34.1	11.4	—	—
	1:0.1	125.6	—	—	—
	1:0.2	217.8	—	—	—
	1:0.3	242.5	148.3	—	—
24 hr.	Amino acid alone	663.0	—	117.7	—
	1:0.3	267.5	—	41.9	—
72 "	Amino acid alone	—	796.0	—	49.4
	1:0.3	—	212.1	—	29.2

(glycine and alanine) and sugars (glucose and fructose) were examined in the presence of hydrogen peroxide at alkaline reaction. 16.67 cc. of M solution of the amino acid and 8.33 cc. of M solution of the sugar (molar ratio = 1:0.5) were diluted to 100 cc. with NaOH solution in the presence and absence of 5 cc. or 30% hydrogen peroxide. The end-concentration of NaOH was $0.5N$ and the

temperature was 37°C. The data of the reaction between glucose and glycine are shown in Table V.

TABLE V.

Action of Glucose on Glycine in the Presence of H_2O_2 .

In 100 cc.: 16.67 cc. of *M* glycine, 8.33 cc. of *M* glucose, 10 cc. of 5*N* NaOH, 3 cc. of 30% H_2O_2 , 37°C.

Time (min.)	Decrease of glycine (mg.)		Decrease of glucose (mg.)		Production of ammonia (mg.)	
	Glycine alone	+ Glucose	Glucose alone	+ Glycine	Glycine alone	Glycine + glucose
10	5.5	24.6	134.0	94.8	1.1	—
30	15.8	74.9	388.0	315.9	1.4	1.8
60	30.3	88.3	763.5	605.2	—	—
120	54.8	126.8	1076.4	841.9	1.9	3.3
240	80.0	134.6	1361.0	1003.8	2.5	3.5

The oxidative deamination of the amino acid was greatly accelerated by the addition of the sugar. The rate of acceleration was much higher than in the absence of the oxidizing agent. The absolute amount of ammonia produced was increased when the sugar was added, but the percentage of its yield calculated from the quantity of the deaminized amino acid was lower than in the absence of the sugar. The oxidative decomposition of the sugar was retarded by the amino acid; the decrease of the production of acidity or of the consumption of hydrogen peroxide in the presence of the amino acid may be explained by their connection with the retardation of sugar decomposition. No indications were obtained of the formation of cyanic acid and urea either with or without the sugar. The reacting solution remained water-clear; there was no formation of melanoidines.

IV. THE REACTION IN THE PRESENCE OF MOLECULAR OXYGEN.

0.5 gm. of glucose and 2.085 gm. of glycine (molar ratio=1:1) were dissolved and diluted to 100 cc. with 0.5*N* sodium hydroxide solution. A part of the solution was aerated by CO_2 -free, vapour-

saturated air, and another part was kept aside and covered with mineral oil. The temperature of the solution was 37°C. in both cases. Control experiments were made by treating a solution of glucose or glycine alone in aerobic and anaerobic conditions. It is pointed out in Table VI that the accelerating effect of glucose on deamination took place more markedly in the aerated solution than in the non-aerated solution. In the light of Shaffer and Harned's experiment (1931) this fact is undoubtedly connected with the activation of molecular oxygen in the alkaline solution of the sugar. The aerated solution remained colorless while the non-aerated solution became brown pretty soon.

TABLE VI.

Action of Glucose on Glycine in Alkaline Medium in the Presence of Molecular Oxygen.

In 100 cc.: 208.5 mg. glycine, 500 mg. glucose, 10 cc. of 5*N* NaOH 37°C.

Time (hr.)	Aeration	Decrease of glycine (mg.)		Decrease of glucose (mg.)	
		Glycine alone	+ Glucose	Glucose alone	+ Glycine
2	Aerated	2.6	14.9	190.1	178.8
	Not aerated	3.3	6.4	69.3	59.0
4	Aerated	6.4	23.5	329.2	293.6
	Not aerated	6.0	10.5	136.1	127.4
6	Aerated	9.2	37.2	407.2	375.0
	Not aerated	9.2	15.0	207.9	193.4

It may be concluded from the results of the experiments mentioned above that the sugar which is in process of oxidative decomposition has the accelerating effect on the deamination of the amino acid.

The expense of this work was defrayed by a grant from the Department of Education.

SUMMARY.

1. The sugar has a retarding effect on the deamination of

the amino acid in the presence of alkaline permanganate. Evidence has been submitted to show that this retarding effect is only apparent. In the presence of the sugar which has primarily an accelerating influence on the deamination, the reaction between amino acid and sugar was paralysed by the "coagulation" of the reacting solution at an early stage of the reaction.

2. The deamination of the amino acid in the acid permanganate solution was remarkably accelerated by the addition of the sugar.

3. The accelerating effect of the sugar was also noticed when the alkaline solution of the amino acid was treated with hydrogen peroxide or with molecular oxygen.

REFERENCES.

- Borsook, H. and Wasteneys, H. (1925): *Biochem. J.*, **19**, 1128.
Fearon, W. R. and Montgomery, E. G. (1924): *Biochem. J.*, **18**, 576.
Fosse, R. (1919): *Compt. rend. Acad.*, **154**, 1448; *ibid.* **168**, 320, 908, 1164; *Compt. rend. Soc. Biol.*, **82**, 480, 749, 1062.
Fosse, R. (1920): *Compt. rend. Acad.*, **171**, 398; *Ann. Inst. Pasteur*, **34**, 715.
Fosse, R. (1921): *Bull. Soc. chim.*, [4], **29**, 158; *Compt. rend. Acad.*, **172**, 160, 684, 1240; *ibid.*, **173**, 318, 1370; *Compt. rend. Soc. Biol.*, **84**, 396; *ibid.*, **86**, 175, 179.
Fosse, R. (1922): *Compt. rend. Acad.*, **174**, 39.
Shaffer, P. H. and Harned, B. K. (1931): *J. Biol. Chem.*, **93**, 311.
Watanabe, J. (1932): *J. Biochem.*, **16**, 163.

ÜBER DAS SCHICKSAL DER DEHYDROCHOLSÄURE IM HUNDEORGANISMUS.

VON

SHIGETOSHI SHIBUYA.

(Aus dem Biochemischen Institut Okayama, Japan.

Vorstand: Prof. Dr. T. Shimizu.)

(Eingegangen am 30. November 1932)

Seit Neubauer (1922) ist bekannt, dass die Dehydrocholsäure eine choleretische Wirkung hat und in der Klinik als Cholereticum benutzt wird. Neuerdings ist von vielen Autoren, wie Adlersberg u. Roth (1927), Murakami (1928) und Tanaka (1931) bewiesen worden, dass sie eine der Cholsäure genau gleichkommende hypoglykämische Wirkung zeigt.

Es ist daher interessant, das Schicksal der ungekuppelten Gallensäure im Organismus zu erforschen, um so mehr, weil in der Fistelgalle des ikterischen Kranken ungekuppelte Gallensäure, Cholsäure u. Desoxycholsäure von Schönheimer, Andrews u. Hrdina (1932) aufgefunden wurden.

Was das Schicksal von parenteral eingeführter Cholsäure und Desoxycholsäure anbetrifft, so wurden hierüber von Higashi (1930) bei Kröten, und von Fuziwara (1930) bei Kaninchen Untersuchungen angestellt und gefunden, dass diese Säuren teilweise unverändert im Harn ausgeschieden werden.

Um zu sehen, ob die Dehydrocholsäure auch unverändert oder gekuppelt im Harn und in der Galle ausgeschieden wird, wenn sie per os verfüttert wird, haben wir die Fistelgalle von mit Dehydrocholsäure gefütterten Hunden untersucht und gefunden, dass die Dehydrocholsäure zum Teil unverändert in der Fistelgalle ausgeschieden wird.

BESCHREIBUNG DER VERSUCHE.

An die Fistelhunde wurde 0,1 g Natriumdehydrocholat pro Kilo täglich 2 mal um 10 Uhr vormittags und um 6 Uhr abends

verfüttert. Die Galle wurde von Mittag bis 5 Uhr nachmittags und von 7 Uhr abends bis zum nächsten Morgen gesammelt. In der Zwischenzeit liess man die Hunde ruhig ihre eigene Galle ablecken. Während des Versuches wurde immer eine bestimmte Nahrung verfüttert. Die verabreichte Dehydrocholsäuremenge betrug insgesamt 25 g und die gesammelte Fistelgalle 1820 cem.

1. *Dehydrocholsäure und Palmitinsäure.*

Etwa 1,8 Liter Fistelgalle wurde unter Befreiung von Muzin durch Alkohol in üblicher Weise mit Eisenchloridlösung gefällt und von der Fällung abfiltriert. Diese Eisenfällung wurde mit Soda zersetzt und filtriert. Das Filtrat wurde abgedampft, in Alkohol gelöst und unter Zusatz von Tierkohle entfärbt. Der nach Abdampfen des Alkohols verbleibende Rückstand wurde in Wasser gelöst und mit verdünnter Salzsäure angesäuert. Die dabei ausgeschiedene Masse (getrocknet 0,98 g) wurde aus Azeton umkristallisiert.

Hierbei wurden die Kristalle in 2 Teile getrennt, von denen der eine in Alkohol leicht löslich, und der andere in Alkohol schwer löslich war.

Aus dem ersteren wurde eine in Blättchen kristallisierende Masse erhalten, die in siedendem Alkohol, Äther und Chloroform spielend leicht, in kaltem Alkohol schwer und in Wasser gar nicht löslich war. Der Kristall, der mehrmals aus Alkohol umkristallisiert wurde, schmilzt bei 60°C. Er nimmt kein Brom auf.

Titration: 0,2180 g Substanz brauchten $8,2 \text{ cem } \frac{N}{10} \text{ KOH}$

Äquivalent für $\text{C}_{16}\text{H}_{32}\text{O}_2$	Ber.	256
	Gef.	265

Nach diesen Resultaten stimmt der Kristall mit der Palmitinsäure überein.

Aus dem anderen Teil wurde ein feiner Nadelkristall gewonnen, der aus Azeton mehrmals umkristallisiert wurde. Der Kristall schmilzt bei 236°C und ergibt keine Pettenkofer'sche Reaktion. Er ist in Wasser unlöslich, in kaltem Alkohol und Azeton ziemlich

schwer löslich und schmeckt intensiv bitter. Die Ausbeute betrug 0,51 g. Die spezifische Drehung als 0,935%ige Lösung in absolutem Alkohol ist:

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{0,57 \times 100}{0,935 \times 2} = +30,1$$

Diese Ergebnisse zeigen, dass die erhaltene Säure Dehydrocholsäure ist.

2. CHOLSÄURE UND TAURIN.

Aus dem von der Eisenfällung abgetrennten Filtrat wurde nach der Methode von Hammarsten (1904) keine kristallisierte Gallensäure erhalten, sondern etwa 13 g einer syrupösen Masse, die in üblicher Weise durch Hydrolyse mit Alkali in eine Säure und in einen schwefel- u. stickstoffhaltigen prismatischen Kristall zerlegt wurde.

Diese Säure wurde zuerst aus Essigäther, dann aus Alkohol umkristallisiert. Der prismatische Kristall ist in Alkohol u. Azeton leicht löslich, aber in Wasser unlöslich. Er schmeckt bitter, ergibt die Pettenkofersche und Miliussche Reaktion und schmilzt bei 197°C. Die spezifische Drehung als 0,95%ige Lösung in absolutem Alkohol ist:

$$[\alpha]_D^{20} = + \frac{0,70 \times 100}{0,95 \times 2} = +36,8$$

Dieses Ergebnis beweist, dass die erhaltene Säure Cholsäure ist.

Aus dem von der Cholsäure befreiten Hydrolysat wurde nach der Methode von Salkowski ein prismatischer Kristall erhalten, der in Wasser äusserst leicht löslich, aber in absolutem Alkohol unlöslich ist. Er ist schwefel- u. stickstoffhaltig und schmilzt bei 297°C. Der Kristall ist also höchst wahrscheinlich Taurin.

Ob die hier erhaltene Cholsäure restlos eigentliche Cholsäure ist, oder z. T. aus Dehydrocholsäure gebildet wird, ist schwer zu entscheiden. Es ist aber sicher, dass von der verfütterten Dehydrocholsäure etwa 2% in der Fistelgalle des Hundes unverändert wieder ausgeschieden werden.

Zum Schluss möchte ich Herrn Dr. Z. Uraki, der mir bei

der Ausführung dieser Arbeit geholfen hat, meinen herzlichsten Dank aussprechen.

LITERATUR.

- Adlersberg, D. u. Roth, E. (1927): Schmiedeberg's Arch., **121**, 131.
Fujiwara, K. (1930): Arb. a. d. Med. Univ. Okayama, **2**, 291.
Higashi, S. (1930): Arb. a. d. Med. Univ. Okayama, **2**, 100.
Hammarsten, O. (1886): Chem. Ber., **14**, 71.
Murakami, K. (1928): Jl. of Bioch., **9**, 261.
Schönheimer, R., Andrews, E. u. Hrdina, L. (1932): Z. f. Physiol. Chem., **208**, 182.
Tanaka, K. (1931): Jl. of Bioch., **14**, 463.